

Rec'd PCT/PTO 09 SEP 2004  
PCT/JP03/02918

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

12.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日  
Date of Application:

2002年 3月12日

出願番号  
Application Number:

特願2002-067702

[ST.10/C]:

[JP2002-067702]

REC'D 09 MAY 2003

WIPO PCT

出願人  
Applicant(s):

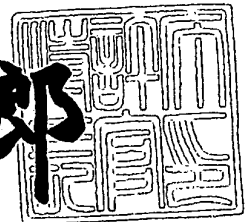
科学技術振興事業団  
正井 久雄  
株式会社医学生物学研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028855

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 M3-A0201

【提出日】 平成14年 3月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/48

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都港区三田 5 - 7 - 8 シャンボール三田 6 2 0 号

    【氏名】 正井 久雄

【発明者】

    【住所又は居所】 長野県伊那市大字美簗 7 4 4 8 - 3 7 4

    【氏名】 玉井 克之

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

    【識別番号】 598150570

    【氏名又は名称】 正井 久雄

【特許出願人】

    【識別番号】 390004097

    【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】Cdc7-ASKキナーゼ複合体、該キナーゼ複合体の基質、及び該基質に特異的な抗体、並びにこれらを用いたCdc7-ASKキナーゼ阻害能を有する化合物のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法。

- a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でCdc7-ASK複合体と接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である、
- b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および
- c) 前記リン酸化のレベルをCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性と関連付ける工程

【請求項2】リン酸化のレベルを、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体の結合のレベルに基づいて測定する請求項1に記載の方法。

【請求項3】Cdc7-ASK複合体が、生体試料に由来する請求項1に記載の方法

【請求項4】次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法。

- a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～iii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる

ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、

iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる

- b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響と関連付ける工程

【請求項5】 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法。

a) 請求項4に記載の方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程、および

b) 被験化合物を接触させない対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工程

【請求項6】 請求項5のb)において、リン酸化レベルが低い化合物を選択する、請求項5に記載のスクリーニング方法。

【請求項7】 請求項6のスクリーニング方法によって選択される化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤。

【請求項8】 次の要素を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性測定用キット

a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、および

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

【請求項9】 次の要素を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価するためのキット。

a) Cdc7-ASK複合体活性物質、および

b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、

【請求項10】 次の工程を含むCdc7-ASK複合体活性物質の製造方法。

a) ヒトCdc7蛋白質をコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、モノシストロニックに発現可能な状態で原核細胞に導入する工程、

b) 前記2つのDNAを発現させる工程、および

c) 発現された蛋白質を回収する工程、

【請求項 1 1】 配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の 1 7 位セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、C d c 7 - A S K キナーゼ複合体のリン酸化酵素活性測定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

細胞は増殖する際に、そのゲノムDNAを複製し、娘細胞へ均等に分配した後分裂するという過程を周期的に繰り返す。このような周期は細胞周期と呼ばれている。細胞周期はG 1 期（DNA合成準備期）、S 期（DNA合成期）、G 2 期（分裂準備期）、M 期（分裂期）に分けることができ、各段階を順番に経て細胞は分裂する。細胞周期の進行は数多くの分子により精緻な調節を受け、不必要な細胞の増殖を制御している。これまでに細胞周期の進行に関与する分子のクローニングや機能解析が数多く行われ、多くの癌においてこれらの細胞周期の進行に関する分子の異常が報告され、それが発癌の原因となっていると考えられている。

【0 0 0 3】

これまで、種々の制癌剤ないしは抗癌剤が開発されてきた。癌細胞の増殖異常の原因の多くが、細胞周期の進行の異常に由来することが認識されるにしたがって、細胞周期進行制御因子を標的とした制癌剤が精力的に開発されている。中でも、機能の解析が進んでいるCdk-Cyclinは、抗癌剤の標的として最も広く研究されている。そしてCdk-Cyclinを標的とする多くの制癌剤の候補分子が既に報告されている。

【0 0 0 4】

Cdkは多くの構造類似分子がファミリーを構成し、それぞれが種々の細胞周期特異的なCyclin分子と複合体を形成して、細胞周期の種々のステージを制御する。現状では、これらの構造類似分子の中で、特定のCdk-Cyclinのみを特異的に阻害する分子の特定には至っていない。つまり、Cdk-Cyclinを標的として、癌細胞

に対して特異的かつ選択的に作用する分子を得ることは難しかった。また、これまでのところ細胞分裂、あるいはG1（休止）期の制御因子を標的とした制癌剤は多く探索されてきたが、細胞増殖のもうひとつの重要な制御点であるDNA複製の過程を標的とした創薬は少なかった。

## 【0005】

さて、S期の開始時（G1-S移行）においては、Cdk-Cyclinとは別のセリン／スレオニンキナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。すなわち、細胞分裂周期変異株の一つとして単離されたCdc7変異株（J. Mol. Biol. 59:183-194, 1971）において、Cdc7蛋白質キナーゼは染色体DNAの複製の開始直前に機能すること、そしてS期を通じて各複製起点の活性化に必要であることが明らかにされた（Mol. Cell. Biol. 6:1590-1598, 1986; Genes Dev. 15:480-490, 1998; Genes Dev. 15:491-501, 1998）。また酵母Cdc7のキナーゼ活性は、制御サブユニットであるDbf4に依存することも知られている（Genetics 131:21-29, 1992; Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993）。

## 【0006】

酵母におけるDbf4の発現は周期的で、転写レベルおよび翻訳後レベルの両方で制御されている（Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989）。G1-S境界期におけるCdc7キナーゼ活性の増加の少なくとも一部は、Dbf4の発現がG1後期に増加することによって説明されている（Mol. Cell. Biol. 13:2899-2908, 1993; Exp. Cell Res. 180:419-428, 1989）。更にDbf4は細胞内で複製起点と相互に作用する（Science 265:1243-1246, 1994）ことから、Cdc7は複製起点上に形成される複製装置を直接的に活性化することによりS期の開始をトリガーしていると考えられている。

## 【0007】

本発明者は、既にヒトにおける酵母Dbf4のヒトにおけるホモログH37蛋白質とそれをコードするDNAの単離に成功している（特開2000-135090号公報、J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000）。H37は、DNA複製の開始のon/offを司る重要な制御因子である。H37は、後にヒトactivator of S phase kinase (ASK) と名付けられた。

## 【 0 0 0 8 】

ASKはヒト染色体上のユニークな遺伝子で、その機能は染色体複製に必須である。マウスを用いた発生工学的遺伝解析から、Cdc7の機能は細胞レベル及び動物レベルで必須であることが証明された。Cdc7はキナーゼ触媒サブユニットをコードし、ASKは活性サブユニットをそれぞれコードする。両者は複合体を形成し、活性を有するキナーゼとなる。Cdc7-ASKキナーゼの活性は細胞周期で厳密に制御されており、DNAの複製が起こるS期に上昇する。そのキナーゼ活性はS期を通じて高く保たれるが、M期からG1期には検出されなくなる。この活性制御は、主にASK蛋白質の発現レベルの変動に依存している。すなわち、ASK蛋白質はその量が細胞周期で変動し、その結果ASKが結合し制御するヒトCdc7キナーゼの活性も細胞周期中に変動する。

## 【 0 0 0 9 】

また増殖の盛んな癌細胞においては、一般にヒトCdc7-ASKの発現レベル、およびその活性の昂進が観察される。このような癌細胞ではASK蛋白質の発現の昂進によって、ヒトCdc7キナーゼ活性が増加していると考えられる。さらに興味深いことに、本発明者らはASKの発現レベルが種々の培養癌細胞においてその増殖能の上昇に呼応して増加していることを見出している。

## 【 0 0 1 0 】

本発明者のその後の研究によって、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される特異的な基質が、染色体の複製開始に必須なMCM(minichromosome maintenance)複合体（ヘテロ6量体）であることが証明された(J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000)。このような知見を踏まえ、本発明者らは、Cdc7-ASKは複製開始複体内に存在するMCMをリン酸化し、その結果サブユニット構造の再構成を誘導して複製開始に必須な二本鎖DNAの開裂を引き起こすというモデルを提唱している。

このような背景から、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化は、がん細胞の増殖制御における重要な現象であると認識されている。しかし、そのリン酸化の機構には、今なお解明すべき点が多く残されている。

## 【 0 0 1 1 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化の機構を明らかにし、その活性を評価するための方法の提供を課題とする。また本発明は、前記評価方法に基づいて、被験化合物のCdc-ASK複合体による基質のリン酸化作用に与える影響を測定するための方法の提供を課題とする。更に本発明は、これらの方法に有用な、基質、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体の提供を課題とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らはCdc7-ASK複合体は制癌剤の新規かつ重要な標的になると考えた。つまり、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用に対する阻害剤は、癌細胞の増殖を選択的に抑制することができ、有効な制癌剤の候補になると考えた。

Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用の阻害作用を評価するには、まずCdc7-ASK複合体のリン酸化作用を評価する方法の確立が必須である。この課題を解決するために、まず本発明者らは、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化の機構を明らかにした。そしてこの知見に基づいて、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定しうることを確認して本発明を完成した。

## 【0013】

次に、このキナーゼ活性の測定方法を応用して、被験化合物のCdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化作用に与える影響を評価できることを見出した。この知見に基づいて、Cdc7-ASKキナーゼに対する被験化合物の阻害（または促進）作用を評価する方法と、このような作用を有する化合物のスクリーニング方法を確立し、本発明を完成した。

## 【0014】

更に本発明者らは、これらの方法の確立を通じて、これらの方法に有用な新規な基質化合物、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体等を見出し本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法に関する。あるいは本発明は、被験化合物がCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価する方法、およびこの方法に基づくスクリーニング方法に関する。更に本発明は、これらの方法に有用な、基質化合物、抗体、あるいはCdc7-ASK複合体、若し

くはそれらの調製方法に関する。

〔1〕 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法。

a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でCdc7-ASK複合体と接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である、

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルをCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性と関連付ける工程

〔2〕 リン酸化のレベルを、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体の結合のレベルに基づいて測定する〔1〕に記載の方法。

〔3〕 Cdc7-ASK複合体が、生体試料に由来する〔1〕に記載の方法。

〔4〕 次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法。

a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～ii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる

ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、

iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響と関連付ける工程

〔5〕 次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法。

a) 〔4〕に記載の方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性

に与える影響を測定する工程、および

b) 被験化合物を接触させない対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工程

〔6〕〔5〕のb)において、リン酸化レベルが低い化合物を選択する、〔5〕に記載のスクリーニング方法。

〔7〕〔6〕のスクリーニング方法によって選択される化合物を有効成分として含有する、細胞増殖の抑制剤。

〔8〕次の要素を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性測定用キット。

a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、および

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

〔9〕次の要素を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を評価するためのキット。

a) Cdc7-ASK複合体活性物質、および

b) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列の17位のセリン残基を含み、かつ当該アミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を有する基質蛋白質、

〔10〕次の工程を含むCdc7-ASK複合体活性物質の製造方法。

a) ヒトCdc7蛋白質をコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、モノシストロニックに発現可能な状態で原核細胞に導入する工程、

b) 前記2つのDNAを発現させる工程、および

c) 発現された蛋白質を回収する工程、

〔11〕配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質の17位セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法に関する

る。

- a) 基質蛋白質を、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でCdc7-ASK複合体と接触させる工程；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である
- b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および
- c) 前記リン酸化のレベルをCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性と関連付ける工程

【0016】

本発明において、基質蛋白質としては、配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質が用いられる。

MCM2蛋白質の構造は公知である。ヒトMCM2のアミノ酸配列とそれをコードするcDNAの塩基配列を、配列番号：2および配列番号：3にそれぞれ示した。Cdc7-ASK複合体は、配列番号：3に示すヒトMCM2の、特定のアミノ酸残基をリン酸化する。Cdc7-ASK複合体が、MCM複合体、あるいはフリーのMCM2をリン酸化することは、既に本発明者らによって明らかにされている。しかし、MCM2のN末端から数えて17番目に位置するセリンが、Cdc7-ASK複合体によって特異的にリン酸化されることは、本発明者らが明らかにした新規な知見である。

【0017】

したがって、17位セリンを含み、配列番号：3に示すアミノ酸配列から選択された連続するアミノ酸配列を含む蛋白質は、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化が可能な限り、本発明における基質蛋白質に用いることができる。この他本発明の基質蛋白質として、たとえば次の蛋白質を用いることができる。基質蛋白質には、タグを付加することができる。また後に述べるように、基質蛋白質を固相に結合させておくこともできる。

- (a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、
- (b) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列から選択され、かつ17位のセリンを含む連続するアミノ酸配列からなる蛋白質、
- (c) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7

-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

(d)配列番号：3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質

【0018】

本発明において、ある蛋白質がCdc7-ASK複合体によってリン酸化されることは、たとえば実施例に記載したような反応の結果に基づいて、確認することができる。すなわち、リン酸化合物およびCdc7-ASK複合体とともに、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件の元でその蛋白質をインキュベートする。次に、その蛋白質の配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する。測定されたリン酸化のレベルが、たとえば配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質を基質蛋白質に用いた場合と有意な差が見られないとき、その蛋白質は、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質であると判定される。

【0019】

本発明の基質蛋白質を構成するアミノ酸は、通常5以上、通常10以上、好ましくは50以上とすることができる。また基質蛋白質の大きさには制限はないが、たとえば400、通常300、あるいは200以下の短い断片とすることもできる。基質蛋白質を短い断片とすることによって、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化をより特異的に観察することができる。

【0020】

本発明において、好ましい基質蛋白質として、例えば配列番号：1のアミノ酸配列を含む蛋白質を示すことができる。配列番号：1のアミノ酸配列は、配列番号：3に示したヒトMCM2のN末端側の130アミノ酸からなる断片配列である。N末端から数えて17番目に位置するセリンが、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される。

【0021】

この他、配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質を基質蛋白質として用いること

ができる。本発明において変異の対象となるアミノ酸の数は、例えば1～10個であり、好ましくは1～6個、更に好ましくは1～3個である。

このような蛋白質は、配列番号：1に記載のヒトMCM2のcDNAの塩基配列に変異を導入することによって得ることができる。既知の塩基配列からなる遺伝子に変異を導入する技術は公知である。あるいは、化学合成によって目的とするアミノ酸配列からなる蛋白質を調製することもできる。

#### 【0022】

本発明の基質蛋白質において、配列番号：1に示すアミノ酸配列における17位に相当する位置にあるセリンは、Cdc7-ASK複合体のリン酸化の標的として重要である。したがって、アミノ酸配列に変異を有する蛋白質を基質蛋白質として用いる場合であっても、17位、または17位に相同な位置にあるセリンは、保存することが重要である。17位に相同な位置とは、あるアミノ酸配列を配列番号：1のアミノ酸配列と整列させたときに、配列番号：1のアミノ酸配列における17位に相当する位置に配置される位置を言う。複数のアミノ酸配列を整列させる方法は公知である。たとえば、blastなどのアルゴリズムに基づいて、異なるアミノ酸配列を整列させるさまざまなソフトウェアが実用化されている。

#### 【0023】

また本発明の基質蛋白質として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列と90%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、ヒトCdc7-ASK複合体によってリン酸化される蛋白質を用いることもできる。たとえばヒトCdc7-ASK複合体は、ヒトMCM2のみならず、マウスのMCM2もリン酸化する。したがって、マウスMCM2は、本発明における基質蛋白質として利用することができる。マウスMCM2のアミノ酸配列は配列番号：5に、このアミノ酸配列をコードする塩基配列を配列番号：4に示した。

#### 【0024】

ただし、本発明においては、ヒトMCM2の17位のセリン、またはこのセリンに相同な位置にあるセリンにおけるリン酸化のレベルを指標として測定している。配列番号：1や配列番号：3に示したアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列からなる蛋白質を基質蛋白質とする場合には、配列番号：1における17位、または

17位に相同な位置にあるセリンを保存することが重要である。たとえばマウスのMCM2においては、26位のセリンが、17位に相同な位置にあるセリンとなる。したがって、マウスのMCM2断片を基質蛋白質に利用する場合には、26位のセリンを含むアミノ酸配列からなる蛋白質を用いるのが望ましい。

## 【0025】

本発明の基質蛋白質は、遺伝子工学的な手法に基づいて得ることができる。すなわち、MCM2をコードするDNAを適当な発現系によって発現させることにより、目的とするアミノ酸配列を有する蛋白質を得ることができる。MCM2をコードするDNAの塩基配列は、配列番号：2に示した。

## 【0026】

たとえば、大腸菌によってMCM2遺伝子を発現させた例を実施例に示した。発現産物は、塩析、ゲルろ過、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等の手法を利用して精製することができる。MCM2に結合親和性を有するタグを融合させておき、このタグに対する結合親和性物質を利用したアフィニティクロマトグラフィーによる精製を利用することもできる。結合性のタグとしては、数個のヒスチジンからなるヒスチジンタグ(His-Tag)、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、GST (Glutathione S-transferase)、チオレドキシン、マルトース結合タンパク、Myc、Xpress、FLAG等を用いることができる。例えば、GSTを用いれば、発現した蛋白質をGlutathione Sepharose 4Bカラムなどで容易に精製することができる。

## 【0027】

なお発現系によっては、MCM2がリン酸化された状態で回収される場合がある。基質蛋白質が発現系においてリン酸化されてしまった場合には、フォスファターゼ等のリン酸基に作用する酵素で処理することによって、蛋白質を脱リン酸化しておくこともできる。本発明の測定方法は、基質蛋白質のリン酸化を指標として測定する工程を含む。したがって、基質蛋白質の、特にCdc7-ASK複合体によってリン酸化される部位は、リン酸化されていない方が望ましい。また、目的とするアミノ酸配列からなる蛋白質を、化学的に合成する方法も公知である。

## 【0028】

本発明のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の測定方法は、前記基質蛋白質と、Cd

c7-ASK複合体のキナーゼ活性を測定すべき試料とを、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下で接触させる工程を含む。本発明において、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件とは、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の発現に好適な条件下を言う。より具体的には、酵素活性の発現に適した温度、塩濃度、pHに調節され、かつ基質蛋白質のリン酸化のためのリン酸化合物を共存させる。酵素活性に適した条件とは、たとえば次のような条件を示すことができる。すなわち、pH7.0-7.5に調節されたHEPES緩衝液中で、上記成分を接触させることによって、このような反応条件を与えることができる。

## 【 0 0 2 9 】

また本発明において、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件とは、基質蛋白質のリン酸化に必要なリン酸基を有する化合物の存在下で、試料と基質蛋白質とを接触させることを言う。リン酸基は、たとえばアデノシン3リン酸（以下、ATPと記載する）を共存させることにより、供給することができる。

## 【 0 0 3 0 】

前記反応を構成する基質蛋白質とリン酸化合物は、試料中のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に対して過剰となるように添加するのが望ましい。一般的には、試料に含まれるCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を正確に予測することは難しい。しかし当業者は、反応に必要な成分が酵素反応に不足しないように、予め十分量の基質化合物、あるいはリン酸化合物を経験的に設定することができる。たとえば、ヒトに由来する生体試料を測定する場合には、基質蛋白質としてたとえば0.1  $\mu$ g以上、通常0.2～1  $\mu$ gを用いる。またリン酸化合物は、ATPとしてたとえば0.01 mM以上、通常0.1～1 mMとなるように添加すれば良い。なおリン酸化合物は、反応系に用いられる基質蛋白質のリン酸化に必要なかつ十分な量を添加するようにする。

## 【 0 0 3 1 】

またリン酸化のための反応時間は、一般に10分以上、好ましくは30分以上、たとえば50～100分間の反応により、基質蛋白質の確実なリン酸化が期待できる。リン酸化に必要な時間は、基質蛋白質の使用量、反応液中のCdc-ASK複合体の活性のレベルによって変動する。当業者は、与えられた条件の元で、リン

酸化に必要な反応時間を適宜設定することができる。

【0032】

本発明の測定方法においては、一定時間内での基質蛋白質リン酸化のレベルが、試料中のリン酸化活性と相関する。あるいは、基質蛋白質を所定のレベルまでリン酸化するのに必要な反応時間を指標として、試料中のリン酸化活性を測定することもできる。すなわち、試料中のリン酸化活性が大きいほど、基質蛋白質のリン酸化は短時間で所定のレベルに達する。更に、基質蛋白質を所定のレベルまでリン酸化するのに必要な試料の量を指標として、試料中のリン酸化活性を測定することもできる。この態様においては、試料中のリン酸化活性の大きさに逆比例して、リン酸化に必要な試料の量は小さくなる。

【0033】

なお試料中のリン酸化活性が予想をはるかに超える場合には、短時間のうちに基質蛋白質の大部分がリン酸化されてしまうことになる。このような状態では、正確にリン酸化活性を評価することができない可能性がある。したがって、このような結果となった場合には、反応に加える試料の量を少なくしたうえで改めてリン酸化活性を測定するのが望ましい。

【0034】

本発明の測定方法は、基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程を含む。当該部位におけるリン酸化のレベルは、たとえば、17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化の状態を識別する抗体を使って、免疫学的に測定することができる。

【0035】

より具体的には、17位に相当するセリンを含むアミノ酸配列からなる蛋白質の、リン酸化されたセリン残基を含む抗原決定基に対する結合活性と比較して、セリンの脱リン酸化によって結合活性が低下する抗体を用いることができる。あるいは逆に、リン酸化されていないセリン残基を含む抗原決定基に結合するが、当該セリン残基のリン酸化によって結合活性が低下する抗体を用いることもできる。

## 【0036】

本発明の測定方法において、リン酸化のレベルを測定するために用いる、前記セリン残基におけるリン酸化のレベルを識別する抗体は、たとえば次のようにして得ることができる。まず免疫原には、当該セリン残基を含む連続したアミノ酸配列からなる合成ペプチドを用いることができる。免疫原とする合成ペプチドの長さは、少なくとも3以上、たとえば5以上、通常10以上、好ましくは10～20アミノ酸とすることができる。たとえば、17位のセリンを含み、配列番号：1に記載のアミノ酸配列から選択された連続する15のアミノ酸で構成されるアミノ酸配列は、免疫原として好ましい。セリンの位置は、任意とすることができる。たとえば実施例においては、15アミノ酸の中央にセリンが位置するアミノ酸配列からなる合成ペプチドを免疫原としている。合成ペプチドは、キャリアー蛋白質と結合させることができる。キャリアー蛋白質としては、たとえばキーホールリンペットヘモシアニン等が用いられる。

## 【0037】

免疫原における17位に相当するセリン残基は、リン酸化しておくことができる。特定のアミノ酸をリン酸化した合成ペプチドを得る方法は公知である。免疫原におけるセリンがリン酸化されていた場合には、リン酸化されたセリンに対する結合活性を有する抗体を得ることができる。

免疫原は、適当なアジュバントと混合して、免疫動物に投与される。免疫は、通常、複数回行われ、抗体価の十分な上昇を確認して、免疫動物の血液を採取する。採取された血液から回収された血清は、本発明の抗体を含む抗血清として用いることができる。抗血清からは、イムノグロブリンを精製することによって、精製抗体を得ることができる。

## 【0038】

あるいは、免疫動物の抗体産生細胞を不死化し、目的とする反応性を有する抗体を産生するクローンを選択することによって、モノクローナル抗体を産生する細胞を樹立することもできる。たとえば、抗体産生細胞をミエローマなどと細胞融合させてハイブリドーマを作成すれば、抗体産生細胞を不死化することができる。

## 【0039】

抗体が目的とする反応性を有することは、免疫原として用いた合成ペプチドを用いて確認することができる。たとえば、リン酸化されたセリンを含む合成ペプチドに結合する抗体を選択することによって、リン酸化した基質蛋白質を認識する抗体を得ることができる。更に、この抗体から、リン酸化していないセリンを含む合成ペプチドに結合する抗体を除くことにより、リン酸化した基質蛋白質に特異的に結合する抗体を得ることができる。このような選択工程によって、抗血清や精製抗体を処理することによって、本発明に必要な基質蛋白質のリン酸化状態を識別する抗体を得ることができる。

同様の選択工程にしたがってハイブリドーマが産生する抗体をスクリーニングすれば、基質蛋白質のリン酸化状態を識別しうるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択することができる。

## 【0040】

本発明の測定方法において、前記抗体は予め標識しておくことができる。抗体の標識によって、リン酸化部位に結合した抗体を容易に検出することができる。また、標識に由来するシグナルを増幅することができれば、より高感度な測定を期待することができる。

## 【0041】

抗体の標識には、任意の標識成分を用いることができる。たとえば、蛍光色素、酵素、あるいは放射性物質等を標識として用いることができる。また、フェリチン、コロイド金等の電子密度の高い物質を標識に用いることもできる。

蛍光色素としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミン  $\beta$  イソチオシアネート (RITC)、フィコエリトリン (PE) 等が挙げられる。酵素としては、ペルオキシシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、シトクロムc等が挙げられる。放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 等が挙げられる。これらの標識成分で抗体を標識する方法は公知である。

## 【0042】

また、リン酸化状態を識別する抗体（一次抗体）に対して結合する抗体（以下

、「二次抗体」という）を用いて抗体を標識することもできる。例えば、基質蛋白質にリン酸化状態を識別する抗体を接触させた後、二次抗体を反応させる。そして、間接的に基質に結合した 2 次抗体量を測定し、この測定量から一次抗体の結合量を求め、そして基質のリン酸化量を得ることができる。たとえば一次抗体にマウスモノクローナル抗体を用いる場合には、抗マウス IgG ヤギ抗体を二次抗体として用いることができる。

## 【 0 0 4 3 】

あるいは、一次抗体を結合親和性物質で標識しておき、この親和性物質に対する結合パートナーの親和性を利用して、抗体を間接的に標識することもできる。たとえば一次抗体をアビジン化しておけば、ビオチン化した酵素をアビジン-ビオチン間の親和性によって、抗体に酵素を結合することができる。

## 【 0 0 4 4 】

本発明の測定方法においては、Cdc7-ASK の基質蛋白質を予め不溶性支持体に結合させ、固相化した状態で用いることができる。基質蛋白質を固相化することにより、前記リン酸化状態を識別する抗体との結合を容易に検出することができる。つまり、基質蛋白質に抗体を接触させた後、液相を分離して固相を洗浄することにより、結合した抗体と結合しなかった抗体は容易に分離される。その後、固相（または液相）における抗体を測定すれば、基質蛋白質に結合した（またはしなかった）抗体の量を容易に測定することができる。基質蛋白質の固相への固定化は、基質蛋白質の安定化にも貢献する。

## 【 0 0 4 5 】

基質蛋白質を固定化するための不溶性支持体としては、例えばポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂、ガラス、やミセル粒子等の水に不溶性の物質が用いられ、特にその材質は限定されない。また、不溶性支持体の形状も特に限定されず、トレイ状、球状、棒状、繊維状、セル状、試験管状等の形状のものを採用することができる。基質蛋白質は、物理吸着、または化学結合によって不溶性支持体に固相化することができる。基質蛋白質を固相化した不溶性支持体は、必要に応じてブロッキングすることができる。ブロッキングには、アルブミンやスキムミルクなどが用いられる。不溶性支持体

のブロッキングにより、抗体の不溶性支持体に対する非特異的な結合が抑制される。また、ブロッキングによって基質蛋白質の保護作用も期待できる。

## 【0046】

本発明において、基質蛋白質と結合した（またはしなかった）抗体の量は、試料中に存在するCdc7-ASK複合体のリン酸化酵素活性と関連付けられる。より具体的には、たとえば基質蛋白質のリン酸化されたセリンを含む抗原決定基に結合する抗体を用いた場合には、基質蛋白質に結合した抗体の量は、試料中のCdc7-ASK複合体のリン酸化酵素活性の大きさに比例する。リン酸化酵素活性のレベルが予めわかっているCdc7-ASK複合体標品による測定結果との対比によって、試料中のリン酸化酵素活性を定量的に知ることができる。

## 【0047】

本発明は、基質蛋白質のCdc7-ASKによる被リン酸化領域におけるリン酸化の状態に基づいて、そのキナーゼ活性を測定している。したがって、試料中に共存する可能性があるその他のリン酸化作用を有する物質の影響を受けることなく、Cdc7-ASKのキナーゼ活性を特異的に測定することができる。その結果、本発明の方法に基づいてCdc7-ASKのキナーゼ活性を測定することによって、細胞増殖の状態を特異的に検知することができる。

## 【0048】

Cdc7-ASKは、細胞周期においては、特にS期に高い活性を維持し、G1期には活性が低下する。したがって、Cdc7-ASKのキナーゼ活性の測定は、細胞のG1期からS期への移行の指標として有用である。S期は細胞の増殖に備えて核酸の複製が進行する時期である。したがって、たとえばある生体試料中の細胞にS期にある細胞が多く見出されることは、その試料では、細胞の増殖が進行していることを意味している。より具体的には、癌組織中に本発明の測定方法によってCdc7-ASKのキナーゼ活性の高い細胞が多く見出されれば、その癌組織には活発に増殖している細胞が多く含まれることを示している。つまり、悪性度の高い癌である可能性がある。

## 【0049】

また本発明は、次の工程を含む、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性

に与える影響の測定方法に関する。

a) 被験化合物、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを、次のi)～iii)のいずれかに記載の順序で接触させる工程、；ただし基質蛋白質は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を含む蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質である

i) 被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる

ii) 被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる、

iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させる

b) 基質蛋白質の、配列番号：1に示すアミノ酸配列において17位に相当する位置のセリン残基におけるリン酸化のレベルを測定する工程、および

c) 前記リン酸化のレベルを、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響と関連付ける工程

#### 【0050】

上記方法において、Cdc7-ASK複合体活性物質とは、Cdc7-ASK複合体と機能的に同等な複合体を言う。より具体的には、Cdc7-ASK複合体活性物質とは、基質蛋白質における被リン酸化セリンをリン酸化する作用を有する複合体と定義される。したがって、複合体を構成するCdc7、あるいはASKが、ヒト由来の蛋白質とは異なる構造を有するものであっても、当該活性を有する複合体を構成する場合には、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質として利用することができる。

#### 【0051】

ある蛋白質複合体が、基質蛋白質における被リン酸化セリンをリン酸化する作用を有することは、たとえば実施例に示すような方法に基づいて確認することができる。すなわち、前記基質蛋白質とその蛋白質複合体とを、基質蛋白質のリン酸化が可能な条件下でインキュベートする。インキュベート後の基質蛋白質のリン酸化のレベルが、ヒトCdc7-ASK複合体とインキュベートした場合と比較して、有意な差が見られない場合に、その蛋白質複合体は、Cdc7-ASK複合体と機能的に同等であると判定される。

## 【 0 0 5 2 】

ヒトに由来するCdc7とASKの構造は公知である。ヒトCdc7をコードするcDNAの塩基配列を塩基配列：6に、またヒトCdc7のアミノ酸配列を配列番号：7に示した。またヒトASKをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：8に、またヒトASKのアミノ酸配列を配列番号：9に示した。これら公知のCdc7、あるいはASKに対して、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質を構成する各サブユニットとして、たとえば次のような蛋白質を用いることができる。本発明において、天然のヒトCdc7、あるいはヒトASKと異なる構造を有するが、キナーゼ活性を有するCdc7-ASK複合体活性物質を構成することができるサブユニットを、それぞれCdc7サブユニット、およびASKサブユニットと言う。

## 【 0 0 5 3 】

まずCdc7サブユニットとしては、以下のポリヌクレオチドによってコードされ、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質を用いることができる。

- (a) 配列番号：6に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号：7に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド
- (d) 配列番号：6に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

## 【 0 0 5 4 】

本発明において、上記ポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質が、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成することは、次のようにして確認することができる。すなわち、まず上記ポリヌ

クレオチドをヒトASKをコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するCdc7サブユニットは、前記ヒトASKとの複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

## 【 0 0 5 5 】

一方、ASKサブユニットとしては、以下のポリヌクレオチドによってコードされ、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質は、本発明のCdc7-ASK複合体活性物質を構成するASKサブユニットとして用いることができる。

- (a) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号：9に記載のアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド
- (d) 配列番号：8に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質をコードするポリヌクレオチド

## 【 0 0 5 6 】

本発明において、上記ポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質が、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成することは、次のようにして確認することができる。すなわち、まず上記ポリヌクレオチドをヒトCdc7をコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較

する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するASKサブユニットは、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

## 【 0 0 5 7 】

たとえば本発明者らは、ヒトASKを構成する 6 7 4 個のアミノ酸配列中、N末端側からカウントして 1 7 4 - 3 4 9 の位置に相当するアミノ酸配列からなる蛋白質は、Cdc7との複合体の形成と、キナーゼ活性の発現に必須の領域であることを明らかにした。当該領域を構成するアミノ酸配列を配列番号：10に示した。このようなヒトASK蛋白質の断片は、前記活性を有する限り、本発明におけるCdc7-ASK複合体活性物質を構成するASKサブユニットとして用いることができる。

## 【 0 0 5 8 】

本発明において、上記のCdc7サブユニット、あるいはASKサブユニットをコードするポリヌクレオチドは、任意のcDNAライブラリからPCRやハイブリダイズスクリーニングによって取得することができる。cDNAライブラリーとしては、ヒトをはじめとして、マウスやラットなどのヒト以外の哺乳動物、あるいは線虫や分裂酵母などの真核細胞に由来するライブラリーを用いることができる。

## 【 0 0 5 9 】

本発明のCdc7-ASK複合体活性物質は、細胞から抽出することもできるし、遺伝子工学的手法によって製造することもできる。遺伝子工学的な手法による製造方法は、多量の蛋白質を容易に得ることができるので望ましい。本発明のCdc7-ASK複合体活性物質として、たとえば昆虫細胞で発現させたヒトCdc7とASKからなる複合体を用いることができる。

## 【 0 0 6 0 】

たとえば本発明者らは、このような複合体の製造に既に成功している(J. Biol. Chem. Vol. 275, No. 37, 29042-29052, 2000)。より具体的には、たとえば次の工程a)-c)にしたがって昆虫細胞を利用して、本発明に用いるCdc7-ASK複合体活性物質を得ることができる。

a) ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、ヒトASKサブユニットをコードするDNAとを昆虫細胞に導入するステップ、

b)前記昆虫細胞において、導入した前記二つのDNAを共発現させるステップ、及び

c)発現された蛋白質（複合体）を精製するステップ、

#### 【 0 0 6 1 】

前記ステップa)で用いられるヒトCdc7サブユニットをコードするDNAは、前記a)-e)に記載のいずれかのポリヌクレオチドを用いることができる。また、その形態も限定されず、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含まれる。例えば、ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAとして、配列番号：6に示した塩基配列を有するDNAを利用することができる。

#### 【 0 0 6 2 】

同様に、ステップa)で用いられるヒトASKサブユニットをコードするDNAは、前記a)-e)に記載のいずれかのポリヌクレオチドを用いることができる。例えば、ヒトASK蛋白質をコードするDNAとして、配列番号：8に示した塩基配列を有するDNAを利用することができる。

#### 【 0 0 6 3 】

昆虫細胞には、*Spodoptera Frugiperda*由来のSf9細胞やSf21細胞、*Trichoplusia ni*由来のTn5細胞を用いることができる。これらの細胞は市販されており（Invitrogen社製、Pharming社製）、またATCCから入手することもできる。Cdc7サブユニット、およびASKサブユニットをコードするDNAは、バキュロウイルスを利用して昆虫細胞へ導入することができる。たとえば、トランスファーベクターへこれらのDNAをサブクローニングし、得られたプラスミドとバキュロウイルスDNAとを同時に昆虫細胞にトランスフェクションすることによって、相同組み換えにより組換え体ウイルスが作製される。この組換え体ウイルスを昆虫細胞に感染させ、昆虫細胞内でCdc7サブユニットとASKサブユニットとを共発現させる。発現される蛋白質量を増大させるために、この蛋白質の発現に先立って組換え体ウイルスの精製、増幅などを行うことが好ましい。

#### 【 0 0 6 4 】

トランスファーベクターとしては、市販のpVL1392（Pharming社製）、pPAK8（Clontech社製）、pAcUW51（Pharming社製）、pAcUW31（Clontech社製）、pA

cAB3 (Pharmlngen社製) などを用いることができる。特に、Cdc7サブユニットおよびASKサブユニットを同時にサブクロニングできるものはトランスファーベクターとして好ましい。たとえば、pAcUW51 (Pharmlngen社製) などのプロモーターを2つ有するトランスファーベクターや、pAcAB3 (Pharmlngen社製) などのプロモーターを3つ有するトランスファーベクターを利用することにより、2つの遺伝子をサブクロニングすることができる。あるいは、Cdc7サブユニット、およびASKサブユニットをサブクロニングするトランスファーベクターとしてそれぞれ異なるものを利用することもできる。

## 【0065】

また、バキュロウイルスDNAとしては、BaculoGold Linearized Baculovirus DNA (商品名、Pharmlngen社製)、野生型Baculovirus AcNV DNA (Pharmlngen社製、Invitrogen社製) などを用いることができる。尚、バキュロウイルスを利用した発現系については各種キットが市販されており、それらを利用してもよい。

## 【0066】

以上のトランスファーベクターとバキュロウイルスとを用いて、外来遺伝子であるCdc7サブユニットとASKサブユニットの遺伝子を昆虫細胞において共発現させることができる。発現可能な条件下で形質転換細胞を培養し、発現生成物を回収することにより、本発明に用いるCdc7-ASK複合体活性物質を得ることができる。回収を容易にするために、Cdc7およびASKのいずれか、あるいは両方に、適当なタグを融合させておくこともできる。

## 【0067】

また、次に述べる方法にしたがって、原核細胞において、Cdc7サブユニットとASKサブユニットの複合体を得ることもできる。たとえば原核細胞として大腸菌を用いる場合には、以下の工程により、Cdc7-ASKキナーゼ複合体活性物質を調製することができる。

A) ヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、配列番号：10に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNAとを、モノシストロニックに発現可能な状態で大腸菌に導入する工程、

B) 前記二つのDNAを発現させる工程、および

C)発現された蛋白質を回収する工程、

【0068】

本発明者らの検討によれば、大腸菌の系においてはヒトASK蛋白質の全長ではなく部分ASK（配列番号：10）を導入して発現させることにより、最終的にキナーゼ活性を有するCdc7-ASK複合体活性物質を取得することができた。また本発明において、配列番号：10に示すアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質とは、Cdc7サブユニットと複合体を構成してキナーゼ活性を発現することができる蛋白質を言う。

ある蛋白質がCdc7サブユニットと複合体を構成してキナーゼ活性を発現することは、次のようにして確認することができる。すなわち、まずその蛋白質をコードするDNAをヒトCdc7をコードする塩基配列からなるDNAとともに適当な宿主細胞で共発現させる。得られた発現産物について、たとえば実施例に記載したような方法によって、リン酸化活性を評価し、Cdc7-ASKが有するリン酸化活性と比較する。その結果、両者のリン酸化活性に有意な差が見られない場合には、その複合体を構成するASKサブユニットは、前記ヒトCdc7との複合体を形成して基質蛋白質のリン酸化作用を有する複合体を構成する蛋白質であると判断される。

【0069】

機能的に同等な蛋白質として、配列番号：10に示すアミノ酸配列と90%以上の相同性を有し、前記活性を保持した蛋白質を示すことができる。また、配列番号：10に示すアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が、置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなり、前記活性を保持した蛋白質は、機能的に同等な蛋白質に含まれる。変異を加えるアミノ酸の数は、通常20以下、たとえば10以下、好ましくは5以下、たとえば1～3である。本発明における機能的に同等な蛋白質には、配列番号：10に示すアミノ酸配列にタグを融合させた蛋白質が含まれる。

【0070】

工程A)では、上記と同様のヒトCdc7サブユニットをコードするDNAと、ヒトASKサブユニットの断片配列をコードするDNA（以下、略して「部分ASK」ともいう）が使用される。断片配列からなる蛋白質には、配列番号：10に示すアミノ酸配

列からなる蛋白質、または該蛋白質と機能的に同等な蛋白質を用いる。配列番号：10のアミノ酸配列は、配列番号：9に示すアミノ酸中、174番目のアミノ酸から349番目のアミノ酸までのアミノ酸配列に相当する部分配列である。このアミノ酸配列を含む蛋白質の断片は、ヒトCdc7と複合体を形成しキナーゼ活性の発現に必要な領域である。ここで、部分ASKは部分ASK蛋白質をコードする限りその配列は限定されず、コドンの縮重を考慮した任意の塩基配列を有するDNAが含有される。また、その形態も限定されず、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAが含有される。

## 【0071】

本発明において、モノシストロニックに発現可能な状態とは、Cdc7サブユニットをコードするDNAとASKサブユニットをコードするDNAとが、1つのmRNA分子として転写され、2つの蛋白質分子に翻訳されることを言う。モノシストロニックに発現させるためには、これらのDNAを共通の転写制御領域の制御下に発現できるように配置する。また、2つの遺伝子の間にターミネータなどの転写を終結させる塩基配列が介在しないようにデザインする。更に、2つの遺伝子は接近して配置することが望ましい。ただし、両者の翻訳フレームが連続すると、1つの融合蛋白質として翻訳されてしまうので、両者の間には終止コドン配置する。

## 【0072】

またmRNA上の2つの蛋白質コード領域に対してそれぞれの翻訳を効率的に行わせるために、2つの遺伝子の間にRBS（リボソーム結合配列-Shine-Dalgarno配列）を配置することは有効である。実施例において、ヒトCdc7と、配列番号：10にアミノ酸配列からなるヒト部分ASK蛋白質とを、大腸菌においてモノシストロニックに発現させるためのコンストラクトを示した。コンストラクトの構築に用いるベクターは、制限されない。具体的には、たとえば、実施例に示したようなpGEX-2Tなどの市販のベクターのクローニングサイトに、Cdc7サブユニットと、ASKサブユニットをコードするDNAを順次クローニングすることによって、これらをモノシストロニックに発現可能なベクターとすることができる。

## 【0073】

このようなベクターコンストラクトを、定法により大腸菌に形質転換し、その

培養物から発現産物を回収することにより、目的とするCdc7-ASK複合体活性物質を得ることができる。

#### 【0074】

発現産物は、塩析、ゲルろ過、あるいはイオン交換クロマトグラフィー等の手法を利用して精製することができる。これらの遺伝子工学的手法による複合体の製造方法においては、複合体を構成するサブユニットのいずれか、あるいは両方に、タグを融合させることができる。サブユニットに結合親和性を有するタグを融合させておき、このタグに対する結合親和性物質を利用したアフィニティクロマトグラフィーによる精製を利用することもできる。結合性のタグとしては、数個のヒスチジンからなるヒスチジンタグ(His-Tag)、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、GST (Glutathione S-transferase)、チオレドキシン、マルトース結合タンパク、Myc、Xpress、FLAG等を用いることができる。例えば、GSTを用いれば、発現した蛋白質をGlutathione Sepharose 4Bカラムなどで容易に精製することができる。

#### 【0075】

本発明の測定方法に用いる基質蛋白質としては、先に述べた本発明によるキナーゼ活性測定用の基質蛋白質を用いることができる。本発明において、被験化合物は、前記のi)-iii)に記載のいずれかの順序で、基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質と接触させられる。

i)被験化合物と基質蛋白質とを接触後にCdc7-ASK複合体活性物質を接触させることによって、被験化合物の基質蛋白質に作用してキナーゼ活性を修飾する作用を見出すことができる。ii)被験化合物の共存下で、基質蛋白質とCdc7-ASK複合体活性物質を接触させる場合には、Cdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に対する競合阻害活性を評価することができる。更に、iii) 基質蛋白質、およびCdc7-ASK複合体活性物質とを接触後に、被験化合物を接触させることにより、リン酸化された基質蛋白質に対する被験化合物の脱リン酸化作用を検出することができる。

#### 【0076】

本発明において、基質蛋白質のリン酸化のレベルは、先に述べた本発明のキナーゼ活性の測定方法と同様の方法にしたがって測定することができる。たとえば

、基質蛋白質の被リン酸化部位におけるリン酸化の状態を識別する抗体によって、リン酸化のレベルが測定される。

## 【0077】

リン酸化のレベルの測定の結果は、被験化合物のCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性に与える影響と関連付けられる。たとえば、被験化合物を接触させない対照と比較してリン酸化のレベルが低下した場合、被験化合物はリン酸化に対して阻害的に作用する活性を有すると結論付けられる。また被験化合物によってリン酸化のレベルが上昇する場合には、当該化合物がCdc7-ASK複合体活性物質のキナーゼ活性を促進する作用を有すると結論付けられる。

## 【0078】

リン酸化レベルは、被験化合物を接触させない対照のみならず、キナーゼ活性に対する作用が明らかな化合物の測定結果と比較することもできる。たとえば、キナーゼ活性に対する阻害作用を見出すことを目的とする場合、一定の阻害作用を有することが予め確認されている化合物との比較によって、被験化合物の阻害作用の大きさを評価することもできる。更に、予めキナーゼ活性に対する阻害作用が明らかな物質について上記測定方法を実施しておき、その結果を被験化合物の測定結果と対比させることによって、その作用を定量的に評価することもできる。

## 【0079】

本発明による被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響の測定方法に基づいて、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法を実施することができる。すなわち本発明は、次の工程を含む、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を調節する作用を有する化合物のスクリーニング方法に関する。

- a) 前記方法によって、被験化合物のCdc7-ASK複合体のキナーゼ活性に与える影響を測定する工程、および
- b) 対照と比較して、リン酸化レベルが高い、または低い被験化合物を選択する工程

## 【0080】

本発明のスクリーニング方法において、リン酸化レベルは、被験化合物を接触させない対照のみならず、キナーゼ活性に対する作用が明らかな化合物の測定結果と比較することもできる。たとえば、キナーゼ活性に対する阻害作用を見出すことを目的とする場合、一定の阻害作用を有することが予め確認されている化合物との比較によって、被験化合物の阻害作用の大きさを評価することもできる。比較の結果、より阻害作用の大きな化合物を選択することによって、一定の水準以上の阻害作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。

## 【0081】

本発明のスクリーニング方法において、被験化合物としては、たとえば天然または合成された蛋白質、ペプチド、抗体、動植物や細菌の細胞抽出物、培養上清、あるいは低分子化合物などを用いることができる。これらの被験化合物は、化合物ライブラリーや、遺伝子ライブラリーから得ることもできる。

天然成分を被験化合物に用いる場合には、当業者に公知の方法（例えば、各種クロマトグラフィー）によりこれらを分画して、それぞれ検出を行うことにより、キナーゼ活性を阻害する単一の化合物を最終的に特定することが可能である。これらスクリーニングにより単離されたキナーゼ活性を阻害もしくは促進する化合物は、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の活性調整剤として利用することができる。

## 【0082】

Cdc7-ASK複合体は、生体内においては細胞増殖におけるキーポイントとなっている。したがって、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性の調節によって、細胞増殖を制御することができる。たとえば、Cdc7-ASK複合体のキナーゼ活性を阻害する化合物は、細胞増殖の抑制剤として有用である。より具体的には、本発明のスクリーニング方法によって選択されたCdc7-ASK複合体に対する阻害作用を有する化合物は、がんのような増殖を抑制すべき細胞の制御に有用である。

## 【0083】

本発明のスクリーニング方法では、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質のリン酸化を特異的に検出している。その結果、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物のCdc7-ASK複合体に対する作用は、より特異的であるということ

ができる。このような化合物は、たとえば癌の制御に用いる場合も、増殖段階にある細胞に対して特異的に作用することから、増殖性の細胞に対する選択性の高い薬剤として期待できる。

## 【0084】

これらの化合物は、特にがん治療薬の候補化合物として有用である。本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、キナーゼ活性の活性調整剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内の、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

## 【0085】

加えて本発明は、上記測定方法、またはスクリーニングに用いる、質基質のリン酸化状態を識別することができる抗体を含むキットに関する。本発明のキットは、キナーゼ活性の検出に用いる場合には、前記抗体以外に、例えば基質蛋白質および緩衝液等で構成される。またキナーゼ活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングに用いる場合には、さらにCdc7-ASK複合体活性物質を組み合わせる。基質蛋白質、あるいは前記抗体のいずれかは、上記のような標識を付与することができ、他方を固相化しておくことができる。

## 【0086】

キットには、Cdc7-ASK複合体活性物質の活性や、測定系そのものの検定のために、酵素標品や基質蛋白質標品を組み合わせることができる。これらの標品や、前記抗体には、安定化などのための他の成分を加えることができる。例えば、1%程度のBSA、および終濃度0.2~10%（好ましくは1%）のシュークローズ、フルクトースなどのポリオール類を、標品中に凍結乾燥後の蛋白質変性防止剤として添加することができる。以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

## 【0087】

## 【実施例】

実施例を構成する汎用されている手法は、全て下記の成書に従って行った。実施例で用いられている実験方法は、様々な成書に紹介されている方法を用いれば良く、何ら制限は無い。

J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Ed Harlow and David Lane (1988) *Antibodies, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

大海忍、辻村邦夫、稲垣昌樹 (1994) 細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 抗ペプチド抗体実験プロトコール 株式会社 秀潤社

右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之 (1995) 免疫実験操作法 I・II, 株式会社 南江堂

## 【0088】

## (1) ASK活性ドメインの特定

本発明者らは、分裂酵母のHsk1-Him1/Dfp1を材料として、詳細な変異体解析を行った結果、Dbf4-motif-mとDbf4-motif-Cのみあれば、キナーゼ活性化に十分であることを報告している (Ogino K. et al., J Biol. Chem. 276:31376-31387, 2001)。分裂酵母のHsk1-Him1/Dfp1は、ヒトCdc7-Dbf4に相当する複合体である。この事実に基づいて、ヒトASKにおいてもmotif-Mとmotif-Cのみを含む最小ドメインでキナーゼ活性化に十分であろうと予想した。ヒトASK、出芽酵母Dbf4、および分裂酵母Him1/Cfp1における、motif-Mとmotif-Cの配置を比較した結果を図1に示す。

## 【0089】

具体的には、配列番号：9に示すヒトASKのアミノ酸配列から、173から349番目に相当するアミノ酸配列（配列番号：10）を選択した。この領域をコードするDNAは、ちょうどintronで分断されている。イントロンの存在箇所は、機能的ドメインあるいは機能的モジュールの切れ目であることが多いと提唱されているため、この領域を選択した。

## 【0090】

## (2) Cdc7-ASK複合体活性物質発現用のベクター

大腸菌において、ヒトCdc7とASKの活性ドメインを発現させるために、GST-TAT-ASK(minimum)-HA-huCdc7というプラスミドを作製した。まずGST-TAT-ASK融合蛋白質発現ベクターGST-TAT11を作製した。その後、ASKの下流に制限酵素サイト(NotI)を導入し、このサイトにHA-Cdc7を挿入した。そのさい、HA-Cdc7の直前にRBS(リボソーム結合配列-Shine-Dalgarno配列)を付加した。強力なRBSの付加により、GST-TAT-ASKからHA-Cdc7まで一続きで転写され、ひとつの転写産物から2つの蛋白質がともに効率良く翻訳することができた。具体的な操作は次に示すとおりである。

## 【0091】

以下の2つのプライマーを用いて、ヒトASKのcDNAから173から349番目のアミノ酸をコードする領域をPCR法によって増幅した。

minimum ASK-N (HindIII)

CCC AAG CTT GAC ATT AGA TAC TAC ATT GAA (配列番号: 11)

minimum ASK-C (EcoRI)

CCG GAA TTC TTT CTT TTT AGG TGT GTC CTT (配列番号: 12)

得られた増幅生成物を精製し、GST-TAT11ベクターにクローニングした。このベクターには、GST-TAT-HindIII-ASK-EcoRIの順に各領域が配置されている。GST-TAT11ベクターとしては、pGEX-2T-Tat11-TKベクターを用いた。このベクターは、11アミノ酸からなるTAT配列(YGRKKRRQRRR/配列番号: 13)がGSTベクターに挿入された構造を有している。TKのHindIII-EcoRIサイトを消化して、別にPCRで増幅しておいたminimum ASKを挿入することができる。HindIIIのフレームはAAGCTTとなることから、このベクターではEcoRIサイトのすぐ下流に3FRAMEで停止コドンに達するため、翻訳はすぐに終了する。

## 【0092】

次にEcoRI-NotIアダプター(AATTGCGGCCGC/配列番号: 14)を用いて、GST-TAT-HindIII-ASK-EcoRIのEcoRIをNotIに置換した。続いて、次のプライマーを用いてヒトCdc7のcDNAからコード領域の全長を増幅した。

huCdc7-RBS-N(NotI)/配列番号: 15

A TAA GAA TGC GGC CGC TAA Gaa gga gAT ATA CAT atg TAC CCC TAC GAC GTG

huCdc7C-NotI/配列番号: 16

ATAAGAATGCGGCGCTTATCACAAGCTCATATCTTT

huCdc7-RBS-N(NotI)の塩基配列中、RBSとATGに相当する領域を小文字で示した。ATG以下の塩基配列でコードされるアミノ酸配列は、MYPYDVDPDYAFSPQRD (配列番号: 17) となり、このうちMYPYDVDPがHAエピトープに相当する。このベクターでは、HAタグに続いてヒトCdc7の14番目以降のアミノ酸配列を連結したアミノ酸配列からなる蛋白質が発現される。先に述べたように強力なRBSを付加したため、2つの遺伝子はともに翻訳される。

なお、Cdc7については野生型とキナーゼ失活型を作製した。キナーゼ失活型はK90Eと呼ばれる、90番目のアミノ酸リジン(K)をグルタミン酸(E)に変異させたアミノ酸配列をからなる。

### 【0093】

#### (3) 細菌におけるCdc7-ASK複合体活性物質の発現と精製

(2) で構築したベクターGST-TAT-ASK(minimum)-HA-huCdc7を、大腸菌C600lon-に常法により形質転換した。C600lon-は、大腸菌の主要なプロテアーゼであるlonを欠損した大腸菌株である。

形質転換した大腸菌は、40  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含有するLB培地200 mlに接種し、37℃で培養した。培養液のOD600が0.5になったところで、IPTGを1 mMになるように添加し、さらに3時間培養した。菌を遠心で回収し、洗浄後、20mlのbufferA (40mM Hepes/KOH [pH7.6] 1mM EDTA, 40 mM potassium glutamate, 10 % glycerol, 1 mM DTT) に懸濁した。超音波処理で細胞を破壊した後、遠心で可溶性画分と沈澱 (不溶性画分) に分画した。可溶性画分に1mlのglutathione Sepharose 4Bを添加した。4℃で1時間かくはんした後、遠心によってglutathione Sepharose 4Bを回収し、簡易カラムに詰めてbufferAでよく洗浄した。カラムボームの20倍量以上のbufferAを用い、溶出液のOD280が0.01以下になるまで洗浄した。その後、20 mM glutathioneを含有するbufferA、引き続いて50 mM glutathioneを含有するbuffer Aで溶出した。

最終的に溶出された画分をSDS-PAGEで分離後に銀染色したところ、GST-ASK (

約 5 0 kDa) および、HA-Cdc7 (約 65 kDa) が精製されていることが確認された。

#### 【 0 0 9 4 】

##### ( 4 ) 細菌によるMCM2(1-130)の発現と精製

Jurkat cellから、ISOGEN (ニッポンジーンCat No. 311-02501) を用いてtotal RNAを調製し、You-Prime First-Strand Beads (アマシャムファルマシア社Cat No. 27-9264-01) を用いてcDNAを作製した。このcDNAを鋳型として、Expand High Fidelity PCR System (ベーリンガーマンハイム社Cat No. 1732-650) と下記のプライマーを用いてヒトMcm2(1-130)の cDNAを増幅した。得られた390bpのPCR産物を制限酵素BamHIとXhoIで消化後、大腸菌の発現ベクターであるpGEX-4T-1 (アマシャムファルマシア社) のBamHI / XhoIサイトにクローニングした。塩基配列を決定し、得られたcDNAの配列がヒトMCM2(1-130)であることを確認した。

PCRに使用したプライマーを以下に示す。

Forward : 5' -CAC GGA TCC ATG GCA TCC AGC CCG GCC CA-3' (配列番号 : 1 8)

Reverse : 5' -GTG CTC GAG CAT CGC TGT CAT ACA GGA GCC-3' (配列番号 : 1 9

)

#### 【 0 0 9 5 】

MCM2(1-130)/pGEX-4T-1を大腸菌DH5aに、形質転換した。その大腸菌を30℃で約5時間培養した後、吸光度 (600nm) が0.8になったところで培養温度を20℃に下げ、終濃度が0.2mMになるようにIPTGを加え、20℃、16時間培養後、集菌した。集めた大腸菌は、氷冷の可溶化緩衝液 (PBS, 0.1%TritonX100, 1mM PMSF) でけん濁し、氷中で超音波破碎機をもちいて溶解した。溶解した粗抽出液を高速遠心機で15000回転30分間遠心して、可溶性画分と不溶性画分とを分離した。それぞれをSDS-PAGE電気泳動を行ってGST-fusion Mcm2(1-130)が可溶性画分にあることを確認した。2mlのGSH-Sepharose 4B (アマシャムファルマシア) 充填したカラムに可溶性画分を添加した後、洗浄液 (20mM Tris-HCl pH7.9, 0.5M NaCl, 5mM imidazole) 50mlで洗浄し、溶出液 (10mM Glutathione, 50mM Tris-HCl, pH9.6) で2mlずつ10本溶出した。吸光度 (A280nm) を測定し0.1以上を集めて氷冷のPBSに一晩透析した。透析した蛋白は、抗MCM2特異抗体を用いたWestern Blottingにより、GST-fusion MCM2(1-130)であることを確認した。

## 【0096】

## (5) MCM2の被リン酸化部位の特定

まずヒト、マウス、カエル、ショウジョウバエ、分裂酵母、出芽酵母などの、MCM2の一次構造をアラインし、保存されているセリン、スレオニン残基を同定した。機能的に重要なリン酸化部位は種を越えて保存されているだろうという仮定に基づいている。これらの保存セリン、スレオニン残基が比較的クラスターを形成して数多く存在する部を8ヶ所 (F1, F2, F3, F4, F5, F6 NF1, NF2) 選定した。

## 【0097】

各領域について、それぞれの部位で4-7残基のセリン、スレオニン残基をアラニンあるいは、グルタミン酸に置換した変異MCM2を作製した。変異体の作製は、オリゴヌクレオチドを用いた方法によった。これを、昆虫細胞発現ベクターUW31上にクローン化した。UW31は2種類の遺伝子産物を同時に発現することが可能なベクターであり、histidine-tagのついたMCM7とともに、各種変異MCM2を共発現する組み換えウィルス溶液を得た。Histidine-tagのMCM4とMCM6を共発現する組み換えウィルス溶液とともに、昆虫細胞Sf9に共感染し、細胞抽出液を作製した。これから、ニッケルカラムによりMCM2-4-6-7複合体のaffinity精製をおこなった。

## 【0098】

目的のMCM2-4-6-7複合体が溶出している画分をプールした。次にmonoQカラム (PharmaciaのSMARTシステムを使用) によりさらに、MCM2-4-6-7複合体を精製した。0.3-0.35M NaClに溶出されるピーク画分をプールし、透析し塩濃度を低下させてから、in vitroリン酸化反応の基質として使用した。

また、同時に、これらの保存部位の一部を含むポリペプチドをhistidine-tagあるいはGST-tag付きで作製し、大腸菌で発現し、精製した。これらの作製は、制限酵素サイトを付加したプライマーオリゴヌクレオチドで目的のコード領域を増幅し、histidine-tag発現ベクター (pT7-7/pQE30) あるいは、GST-fusion発現ベクター (pGEX-5X-3) にクローン化した。野生型およびアラニン置換変異体を発現した。これらの発現ベクターをDE3あるいは、C600lon-株にそれぞれ導入し、発

現誘導し、ニッケルカラムあるいはglutathione Sepharose beadsカラムでaffinity精製をおこなった。これらの蛋白質もin vitroリン酸化反応の基質として使用した。

## 【0099】

変異体MCM2を含むMCM2-4-6-7蛋白質複合体を基質として用いた場合には、どの変異体においても、リン酸化が完全に消失することはなかった。そこで、リン酸化された野生型および変異体MCM2をトリプシン消化の後、2次元クロマトグラフィーにより展開し、スポットが消失するかどうかを解析し、リン酸化部位を限定した。

## 【0100】

また、MCM2はin vivoにおいてもin vitroにおいても、Cdc7によりリン酸化される結果SDS-PAGE上で移動度が下方にシフトする。この現象を指標として、シフトが消失する変異体の同定を試みた。

## 【0101】

これらの結果から、MCM2のN端のCdkおよびCdc7によるリン酸化部位(S27/S41およびS26/S40)があることを同定した。さらにこのリン酸化が、SDS-PAGE上でシフトの原因となっていることを明らかにした。マウスMCM2の26位のセリン残基(S26)に相当するヒトMCM2の17位のセリン残基(S17)は、N末端130アミノ酸ポリペプチドを基質にした場合に効率よくCdc7によりリン酸化されることが明らかとなった。この結果に基づいて、ヒトMCM2のN末端130アミノ酸(配列番号:1)からなる蛋白質を、後述のELISA測定法のための基質蛋白質として使用することにした。

## 【0102】

## (6) 抗リン酸化ペプチド抗体の作製

Cdc7-ASK複合体はヒトMcm2の17番目のセリン残基を特異的にリン酸化することが明らかになったので、次に17番目のセリン残基のリン酸化を検出するための道具として、リン酸化された17番目のセリン残基を特異的に認識する抗リン酸化特異抗体を作製した。

## 【0103】

被リン酸化部位として確定したヒトMCM2タンパク質の17番目のセリン残基を含む、10番目から20番目までのアミノ酸配列に相当する以下の2本のペプチドをペプチド合成機を用いて作製した。

リン酸化ペプチド (Mcm2-phospho-S17と記す) : CRGNDPLTS(p)S (配列番号 : 20)

非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17と記す) : CRGNDPLTSS (配列番号 : 21)

#### 【0104】

上記のペプチド配列は、一文字表記で、アミノ末端からカルボキシル末端方向に記されている。S(p)は、リン酸化セリン残基を示す。アミノ末端のシステイン(C)残基は、ペプチドをキャリアタンパク質に共有結合させるために導入したものである。これらのペプチドは、HPLCにより、95%以上の純度であることを確認した。リン酸化ペプチドは免疫原に用い、抗体力価の測定及び抗体精製にリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを用いた。

#### 【0105】

合成した短いペプチド単独では抗原性が低いので、通常ペプチドをキャリアタンパク質に結合させて動物に免疫する。キャリアタンパク質としては、アルブミン、ミオグロビン、ヘモシアニン等が用いられるが、今回はヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, 以下KLH、CALBIOCHEM社製) を用いた。成書に従い phospho-Hs-S83とKLHを架橋剤であるMBS (m-maleimidobenzoyl- N-hydroxysuccinimide ester, SIGMA社製) を用いて共有結合させ、KLH-Mcm2-phospho-S17を合成した。

#### 【0106】

KLH-Mcm2-phospho-S17 20  $\mu$ g/100  $\mu$ lおよび10  $\mu$ g/100  $\mu$ lをそれぞれウサギおよびマウスの1回あたりの免疫に用いた。これに100  $\mu$ lのフロイト完全アジュバント (ヤトロン社製) を加え、エマルジョン化し免疫原とした。ウサギの背部への皮下注射にて免疫を行った。免疫は2週間ごと3回から5回行い、耳朶静脈から採血後その血清を回収した。抗体力価は、Mcm2-phospho-S17とMcm2-S17を固相化したマイクロタイタープレートを用いたELISA法で測定した。

## 【0107】

十分な抗体力価の確認の後、翌週より、採血（最初の1週間）、休息（次の1週間）、免疫（最後の1週間）を1サイクルとし、これを4回繰り返した。採血は、抗体力価の確認の際と同様に、耳朶静脈より行った。1回の採血あたり、およそ60～70mlの血液を採取した。最後の採血では、カテーテルを用いて心臓より直接血液を回収した。

## 【0108】

採取した血液は、4℃で一晩静置し、血清と血餅に分離させ、上澄み部分の血清を回収した。分離回収した血清に、終濃度 50 %となるように、硫酸アンモニウムを添加し攪拌後、遠心分離を行い、IgG分画を含む沈澱物に最小限のPBSを加え完全に溶解した後、PBSに対して透析を行った。完全に PBS に平衡化した後、この粗精製抗体分画をカラムにかけて、抗体を精製した。

## 【0109】

特異化カラム作製には、Mcm2-phospho-S17合成ペプチドを用い、吸収用カラム作製には、Mcm2-S17合成ペプチドを用いた。合成ペプチド1 mgを5 mlの0.1 M炭酸緩衝液に溶解し、1 mM塩酸で平衡化したCNBr活性化セファロース 4B（ファルマシア社製）を加えた。4℃で一晩穏やかに混和し、これをカラムに充填した。5～10倍量のPBSでカラムを洗浄後、セファロース 4B 表面に残っている活性基をブロッキングするために1 M Tris-HCl(pH7.5)でカラムを平衡化した。ブロッキング後、PBSで洗浄および平衡化し、抗体精製に使用した。

## 【0110】

抗リン酸化ペプチド抗体を精製するため、前述の粗精製抗体分画を特異化カラムに通した。PBS/0.1% TritonX100で洗浄した後、カラムに吸着している抗リン酸化ペプチド抗体を、0.17 M glycine-HCl (pH2.5)で溶出した。溶出した抗体は直ちに1 M Tris-HCl(pH8.0)を適量加えて中和し、PBS に対して透析し、抗Mcm2-phospho-S17抗体分画とした。完全に PBS に平衡化させた後、これを吸収用カラムであるMcm2-S17セファロース 4B カラムに通した。吸収用カラムに通すことにより、抗Mcm2-phospho-S17抗体画分中に存在する非リン酸化ペプチドとも反応する抗体を取り除くことができる。一方、抗リン酸化ペプチド特異抗体は、カラ

ムに吸着せずに、カラムを素通りする。吸収カラムをPBS/0.1% TritonX100で洗浄し、吸収用カラムに結合した抗体は、0.17 M glycine-HCl (pH2.5) で溶出した。溶出後、カラムは、再びPBS/0.1% TritonX100 で平衡化し、非リン酸化ペプチド抗体がほぼ完全に吸収されるまで、抗Mcm2-phospho-S17抗体分画を吸収用カラムに、繰り返して通した。非リン酸化ペプチド感作プレートを用いた ELISA によって、非リン酸化ペプチドとも反応する抗体が除去できている事を確認した。リン酸化ペプチド感作プレートを用いたELISA によって、そのリン酸化ペプチドに対する特異性を最終的に確認した。

#### 【0111】

ペプチドを 1  $\mu\text{g/ml}$  になるように0.1 M炭酸緩衝液 に溶かした。これをELISA 用の96穴マイクロタイタープレートに、1穴あたり50  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。これを4  $^{\circ}\text{C}$  で 一晚放置し感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、ブロッキング溶液 (1% BSA, 5% Sucrose, 0.1%  $\text{NaN}_3$ /PBS) を、1穴あたり200  $\mu\text{l}$  ずつ分注して、室温で1 時間程度放置した。ブロッキング液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させた (固相化)。

リン酸化ペプチド (Mcm2-phospho-S17) 固相化プレートは、それぞれ抗体力価の測定、抗リン酸化セリン残基特異抗体の吸収確認、抗リン酸化ペプチド抗体の特異性の確認に用いた。また、非リン酸化ペプチド (Mcm2-S17) 固相化プレートは、カラムによる非特異抗体の吸収の確認に用いた。

#### 【0112】

力価検定用の血清は、PBSを用いて200倍希釈から、精製抗体は1  $\mu\text{g/ml}$  から、4倍ずつ段階的に希釈し、希釈したサンプルは、感作プレート 1穴あたり50  $\mu\text{l}$  添加した。添加後、室温に1 時間静置した (1次抗体反応)。反応液を捨て、各穴を、PBSで 4 回以上洗浄した。Horseradish Peroxidase (HRP) で標識された抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (2次抗体) を PBSで適当に希釈し、これを各ウェルに50  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、室温で30~60分間反応させた (2次抗体反応)。2次抗体はanti-Rabbit IgG(H+L-chain) conj. Peroxidase (MBL社製)を用いた。2次抗体反応液を捨て、各穴を、PBSで 4 回以上洗浄した。発色基質 (750  $\mu\text{M}$  TMB, Tetramethylbenzidine) 溶液を1穴あたり50  $\mu\text{l}$  添加し、30 $^{\circ}\text{C}$  で 5 ~ 20 分間

発色させた（発色反応）。反応停止液（1.5N  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ）を50  $\mu\text{l}$ ずつ加えて、発色反応を停止させた。最後に、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を測定した。

#### 【0113】

抗Mcm2-phospho-S17抗体を、それぞれ4  $\mu\text{g/ml}$ （抗体）から4倍ずつ段階的に希釈し、リン酸化ペプチド（Mcm2-phospho-S17）固相化プレートと非リン酸化ペプチド（Mcm2-S17）固相化プレートを用いて、ELISA法にて特異性を確認した。

図2は抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体の特異性を確認した結果である。この結果、抗体濃度が高くなるに従い、Mcm2-phospho-S17リン酸化ペプチド固相化プレートでは吸光度が高くなる一方で、Mcm2-S17非リン酸化ペプチド固相化プレートでは吸光度がほぼゼロを維持していることがわかる。したがって、当抗体はヒトの17番目のセリン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体であることが証明された。

#### 【0114】

##### （7）Cdc7-ASK複合体リン酸化酵素活性測定用 ELISA 系の構築

96穴マイクロタイタープレート内でCdc7-ASK複合体リン酸化酵素活性を測定するために、用いる基質となるヒトの17番目のセリン残基を含む領域の選択を行った。具体的には放射性同位元素を用いたリン酸化アッセイにおいてCdc7-ASK複合体の良い基質となることが分かったヒトMCM2の1-130番目までおよび1-80番目のアミノ酸領域のGST融合タンパク質と、10番目から20番目までのアミノ酸配列に相当する非リン酸化ペプチド（Mcm2-S17）を基質として検討した。

#### 【0115】

0.1 M炭酸緩衝液を用いてGST-Mcm2（1-130 aa）およびGST-Mcm2（1-80 aa）を5  $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、ELISA用マイクロタイタープレートに、1穴あたり50  $\mu\text{l}$ ずつ分注して、4  $^{\circ}\text{C}$ にて一晩感作した。感作溶液を除き、ブロッキング溶液（1% BSA, 5% Sucrose, 0.1%  $\text{NaN}_3/\text{PBS}$ ）を、1穴あたり200  $\mu\text{l}$ ずつ分注して、室温で1時間程度放置した。ブロッキング溶液を完全に除去し、ドラフト内で風乾させ、使用まで4  $^{\circ}\text{C}$ で保存した。この操作によりマイクロタイタープレートの内壁にGST-Mcm2（1-130 aa）およびGST-Mcm2（1-80 aa）を固相化した。

## 【0116】

リコンビナントタンパク質GST-Mcm2(1-130 aa)、GST-Mcm2(1-80 aa)あるいは非リン酸化ペプチド(Mcm2-S17)を固相化したウェル中において、タンパク質リン酸化反応を行う。その後、同じウェル中で、連続してELISAを行う。

1倍(x1)から2倍ずつ64倍まで希釈したリコンビナントCdc7-ASK複合体希釈系列をリン酸化緩衝液を用いて調製した。これを50  $\mu$ lずつ固相化プレートのウェル中に添加した(タンパク質リン酸化反応)。30℃で一定時間保温した後、リン酸化反応液を捨て、各ウェルをPBSで4回以上十分に洗浄した。1  $\mu$ g/mlとなるように、抗体希釈液(1% BSA, 0.1%  $\text{NaN}_3$ /PBS)で希釈した一次抗体、すなわち抗Mcm2-phospho-S17 ポリクローナル抗体を、各ウェルに50  $\mu$ lずつ添加して、室温で30~60分間反応させた(1次抗体反応)。1次抗体反応液を捨て、各ウェルをPBSで4回以上十分に洗浄した。Horseradish Peroxidase(HRP)で標識された抗ウサギ免疫グロブリン抗体(2次抗体、MBL社)をPBSで1000倍に希釈し、これを各ウェルに50  $\mu$ lずつ添加し、室温で30~60分間反応させた(2次抗体反応)。2次抗体反応液を捨て、各ウェルを、PBSで4回以上洗浄した。発色基質溶液を1ウェルあたり50  $\mu$ l添加し5~20分間発色させた(発色反応)。反応停止液を50  $\mu$ lずつ加えて、発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nmにおける吸光度を測定した。

## 【0117】

結果を図3に示した。この結果より、本発明で提供される、抗リン酸化ペプチド抗体を用いたELISA法によって、Cdc7-ASK複合体活性物質のタンパク質リン酸化酵素活性を測定できることが明らかになった。このリン酸化酵素活性測定系に用いる基質は、リコンビナントタンパク質GST-Mcm2(1-130 aa)が最も好ましいことが明らかになった。非リン酸化ペプチド(Mcm2-S17)がこの活性測定系に利用できない原因としてはリン酸化部位を含む領域が短く、Cdc7-ASK複合体が標的とする17番目のセリン残基を認識することが難しい事が予想される。また同様な考察を行うことによって、GST-Mcm2(10-20 aa)も本測定系における基質の1つとして提供することも可能と考えられる。

## 【0118】

上記のGST-Mcm2(1-130aa)と抗Mcm2-phospho-S17 ポリクローナル抗体を用いるCdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応液中に添加するATPの終濃度を1  $\mu$ Mから2 mMまで変化させたときの反応性の変化を調べた結果を図4に示す。酵素活性は2mMにおける反応性を100とする相対的活性値(%)で示した。0.1 mMでは90%の活性を示し、1 mMにおいてほぼ反応はプラトーに達している。低濃度のATP存在下においても、最大活性値の30%以上の活性を示すものの、明らかに、ATP依存的な反応性を示した。

## 【0119】

Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応時間を0から150分間まで変化させたときの反応性の変化を調べた結果を図5に示す。反応時間依存的な吸光度の上昇が見られ、90分間においてほぼ反応はプラトーに達している。

## 【0120】

本測定系において、他のリン酸化酵素を用いた場合の検討を行った。GST-Mcm2(1-130 aa)感作プレートと抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体を用いた。酵素には前述のCdc7-ASK複合体(野生型、WT)、非活性型Cdc7-ASK複合体(KD)を用い、それぞれの希釈系列にて活性測定を行った。

結果を図6に示す。Cdc7-ASK複合体 WTは酵素を4倍まで希釈するに従い、吸光度すなわち17番目のセリン残基のリン酸化が低下することが観察された。これはリン酸化酵素活性が存在しないCdc7-ASK複合体 KDでは観察されなかった。以上の事より、本測定系においてCdc7-ASK複合体特異的なリン酸化活性の測定が可能であることが証明された。

## 【0121】

ラジオフィルタアッセイは、酸不溶性画分への放射性同位元素[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATPの取り込みを利用して、基質に対するリン酸化を検出する方法であり、リン酸化活性を測定する場合に頻用される。この方法と本発明で提供されるELISA測定系における感度を比較した。

## 【0122】

1  $\mu$ gのリコンビナントタンパク質GST-Mcm2(1-130 aa)に、1倍(x1)から2倍ずつ64倍まで希釈したリコンビナントCdc7-ASK複合体希釈系列をリン酸化緩衝液

を用いて調製し、全量を50  $\mu$ lにした。30  $^{\circ}$ Cで一定時間保温した後、1 mlの10% トリクロロ酢酸、0.2%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を加え反応を停止させた。この酸不溶性画分をGFCフィルター（Whatman社製）にトラップし、2% トリクロロ酢酸、0.02%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ を用いて3回洗浄した。基質に取りこまれた $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ のカウントを液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 【0123】

結果を図7に示す。それぞれ1倍のCdc7-ASK複合体酵素濃度における、ラジオフィルターアッセイではカウント（cpm）をELISAでは吸光度を100%として相対値（%）にて示した結果である。ELISA法による測定においては、x 8まで100%であることより、放射性同位元素 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた測定系と比較して、約1/8の酵素量で測定できることが示された。またELISA法で用いる基質の量は1ウェルに計算上0.25  $\mu$ gであるのに対し、ラジオフィルターアッセイでは約4倍量の1  $\mu$ g必要とする点、また酵素量ゼロにおけるバックグラウンドがELISA法ではほとんど存在しない事からも、放射性同位元素を使用せずに測定できる利点以上に、感度も高く、かつ用いる基質と酵素も少なくでき、本発明で提供されるELISA測定系がいかに優れているかが証明された。

## 【0124】

リン酸化酵素の阻害剤として知られるK-252a（CALBIOCHEM社製）およびstaurosporineは、CaMキナーゼIIやプロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、プロテインキナーゼGなど、様々なリン酸化酵素の阻害剤として知られている。K-252aとstaurosporineを用いて、本発明で提供されるELISA系にて検討した。それぞれの希釈系列を調製し、これとリン酸化アッセイ緩衝液で調製したCdc7-ASK複合体とを混合し、全量を50  $\mu$ lにした。

これをGST-Mcm2（1-130 aa）を固相化したウェルに添加し、前述の方法でCdc7-ASK複合体リン酸化活性をELISA法にて検討した。

## 【0125】

結果を図8に示す。図8は、阻害剤を加えない場合の活性値を100とする相対的阻害値（%）で示した。各阻害剤のK-252aとstaurosporineは特異性の低いキナーゼの阻害剤であることから、Cdc7-ASK複合体によるリン酸化活性を濃度依存的

に抑制する結果が得られた。IC50は両者とも2 $\mu$ Mであった。一方、Roscovitine、Olomoucine、およびU0126では、Cdc7-ASK複合体に対する濃度依存的な阻害作用が観察されなかった。Roscovitine、およびOlomoucineは、cdk2 inhibitorである。またU0126はMAP kinase inhibitorである。これらのキナーゼ阻害剤はCdc7-ASK複合体の活性を阻害しないことを示している。このことから、実際にCdc7-ASK複合体のリン酸化活性阻害剤の薬剤スクリーニングにも有効であることが示された。

## 【0126】

## 【発明の効果】

本発明によって、Cdc7-ASK複合体による基質蛋白質であるMCM2のリン酸化機構が明らかにされた。この知見に基づいて、基質蛋白質のCdc7-ASK複合体によるリン酸化を、より特異的に評価することが可能となった。つまり、本発明のリン酸化作用の測定方法は、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用を、特異的に評価しうる方法として有用である。

## 【0127】

更に本発明は、上記測定方法を応用した、被験化合物のCdc7-ASK複合体のリン酸化作用に与える影響を評価する方法と、この評価方法に基づくスクリーニング方法を実現した。

本発明のCdc7-ASKキナーゼ活性の測定方法、あるいはその活性を調節する化合物のスクリーニング方法は、Cdc7-ASKを標的とした癌に対する創薬の開発や治療方法の開発に有用である。Cdc7-ASKを標的とすることは、公知の細胞内キナーゼ(Cdk-Cyclinなど)や蛋白質を標的とすることに比べて次のような利点を有する。

## 【0128】

第一に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、より確実な活性の制御を期待することができる。Cdk-Cyclinが多くの類似遺伝子によってファミリーを構成していることに比べて、Cdc7-ASKはより限られた構造の分子で構成されている。したがって、Cdc7-ASKを標的とすることで、その活性を確実に制御することができる。

## 【0129】

第二に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、細胞増殖を特異的に制御することができる。Cdc7-ASKはS期の開始と進行に必要な因子である。その活性の喪失は直ちにS期進行の停止に至り、細胞の増殖が停止する。さらに遺伝子操作を施したマウスを用いた実験から、S期、すなわちDNAの複製の停止はDNA上に異常な構造を蓄積し、それはDNA損傷として感知されてp53の誘導、さらには細胞死が誘導される可能性が示唆されている。つまり、Cdc7-ASKの活性阻害により、癌細胞のS期進行を効果的にブロックし、さらに細胞死を誘導することにより効率よく癌細胞を除去できる可能性がある。

## 【0130】

第三に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、まったく新しい細胞増殖の阻害剤の発見が期待される。Cdc7-ASKのキナーゼとしての構造は、キナーゼファミリーのなかでもユニークである。またASKの構造もこれまで多くの研究がされてきたCyclin分子とは異なっており、キナーゼ活性化についてもこれまで知られていない新規の機構によるものと予測される。したがって、Cdc7-ASKを標的とした活性阻害物質の探索により、これまでの種々のキナーゼに対するスクリーニングでは見出されなかった全く新規な物質が見出される可能性が高い。このことは、たとえば制がん剤の研究開発において、新たなリード化合物の発見につながる可能性があることを意味している。

## 【0131】

そして第四に、Cdc7-ASKを標的とすることにより、細胞死への誘導が期待できる。予期しないDNA複製の停止に対して細胞はATM、Chk1、Cds1などのいわゆるチェックポイントキナーゼを活性化し、細胞周期進行の遅延などを引き起こして対処する。Cdc7-ASKの阻害物質と共に、これらのチェックポイントキナーゼに対する阻害物質も併用すれば、Cdc7-ASKの活性阻害によって引き起こされる、S期進行阻害による細胞死への誘導を増強できることが期待される。

## 【0132】

このように、Cdc7-ASK複合体は、細胞周期において細胞増殖の初期の段階において重要な役割を果たしている。しかも、そのリン酸化活性は、がん細胞の増殖能と比例している。つまり、Cdc7-ASK複合体の活性の制御によって、がん細胞の

増殖をより特異的に制御することができる。したがって、本発明のスクリーニング方法は、がん細胞の増殖を特異的に制御しうる化合物を得る方法として有用である。

## 【 0 1 3 3 】

更に本発明のスクリーニング方法は、被験化合物のCdc7-ASK複合体のリン酸化作用に与える影響を、より特異的に評価することができる。その結果、がんに対してより特異的に作用する化合物を選択することができる。

本発明はまた、上記の各種の方法に必要な、Cdc7-ASK複合体活性物質の調製方法を提供した。本発明の方法によれば、原核細胞を利用して、Cdc7-ASK複合体と同様の活性を有する複合体を、容易に、かつ多量に調製することができる。

## 【 0 1 3 4 】

また発明は、Cdc7-ASK複合体によってリン酸化される基質蛋白質を提供する。本発明の基質蛋白質は、Cdc7-ASK複合体（あるいはCdc7-ASK複合体活性物質）による被リン酸化に必要な構造を有する蛋白質である。このような基質蛋白質の利用により、Cdc7-ASK複合体のリン酸化作用をより特異的に評価することができる。本発明に基づいて調製されたCdc7-ASK複合体活性物質や基質蛋白質は、上記方法に有用である。

## 【 0 1 3 5 】

加えて本発明は、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質によってリン酸化された基質蛋白質の、リン酸化レベルを識別する抗体を提供した。本発明の抗体は、基質蛋白質の特定の部位におけるリン酸化のレベルを識別する。この抗体によって、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質のリン酸化作用を、より特異的に評価することが可能となる。また、本発明の抗体の利用によって、Cdc7-ASK複合体あるいはCdc7-ASK複合体活性物質のリン酸化作用を、イムノアッセイの原理に基づいて容易に評価することができる。

## 【 0 1 3 6 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

Hisao MASAI

Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.

<120> A Cdc7-ASK kinase complex, a substrate thereof, a specific antibody thereof, and a method for screening of a compound having the activity which inhibit the Cdc7-ASK kinase using them.

<130> M3-A0201

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr

1

5

10

15

Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser

20

25

30

Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu  
 35 40 45

Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile  
 50 55 60

Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala  
 65 70 75 80

Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu  
 85 90 95

Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp  
 100 105 110

Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr  
 115 120 125

Asp Ser  
 130

<210> 2

<211> 3379

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (31)..(2709)

&lt;400&gt; 2

aattccgagg aatcatcgga atccttcacc atg gca tcc agc ccg gcc cag cgt 54

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg

1

5

cgg cga ggc aat gat cct ctc acc tcc agc cct ggc cga agc tcc cgg 102

Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg

10

15

20

cgt act gat gcc ctc acc tcc agc cct ggc cgt gac ctt cca cca ttt 150

Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe

25

30

35

40

gag gat gag tcc gag ggg ctc cta ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa 198

Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu

45

50

55

gaa gag gat gga gag gag ctc att gga gat ggc atg gaa agg gac tac 246

Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr

60

65

70

cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc tat gag gcc gag gga ctg gct ctg 294

Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu

75

80

85

gat gat gag gac gta gag gag ctg acg gcc agt cga agg gag gca gca 342

Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Arg Arg Glu Ala Ala

90

95

100

gac ggg cca tgc ggc acg gtg acc ggg agc tgg ccg ggg ctg ggc gca 390

Asp Gly Pro Cys Gly Thr Val Thr Gly Ser Trp Pro Gly Leu Gly Ala

105

110

115

120

tgc gcc gtg ggc tcc tgt atg aca gcg atg agg agg acg agg agc gcc 438

Cys Ala Val Gly Ser Cys Met Thr Ala Met Arg Arg Thr Arg Ser Ala

125

130

135

ctg ccc gca agc gcc gcc agt gga gcc ggc acg gag gac ggc gag gag 486

Leu Pro Ala Ser Ala Ala Ser Gly Ala Gly Thr Glu Asp Gly Glu Glu

140

145

150

gac gag cag atg att gag agc atc gag aac ctg gag gat ctc aaa ggc 534

Asp Glu Gln Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly

155

160

165

cac tct gtg cgc gag tgg gtg agc atg gcg ggc ccc cgg ctg gag atc 582

His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile

170

175

180

cac cac cgc ttc aag aac ttc ctg cgc act cac gtc gac agc cac ggc 630

His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp Ser His Gly

185

190

195

200

cac aac gtc ttc aag gag cgc atc agc gac atg tgc aaa gag aac cgt 678

His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg

205

210

215

gag agc ctg gtg gtg aac tat gag gac ttg gca gcc agg gag cac gtg 726

Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val

220

225

230

ctg gcc tac ttc ctg cct gag gca ccg gcg gag ctg ctg cag atc ttt 774

Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe

235

240

245

gat gag gct gcc ctg gag gtg gta ctg gcc atg tac ccc aag tac gac 822

Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp

250

255

260

cgc atc acc aac cac atc cat gtc cgc atc tcc cac ctg cct ctg gtg 870

Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val

265

270

275

280

gag gag ctg cgc tcg ctg agg cag ctg cat ctg aac cag ctg atc cgc 918

Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg

285

290

295

acc agt ggg gtg gtg acc agc tgc act ggc gtc ctg ccc cag ctc agc 966

Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser

300

305

310

atg gtc aag tac aac tgc aac aag tgc aat ttc gtc ctg ggt cct ttc 1014

Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe

315

320

325

tgc cag tcc cag aac cag gag gtg aaa cca ggc tcc tgt cct gag tgc 1062  
 Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys

330

335

340

cag tcg gcc ggc ccc ttt gag gtc aac atg gag gag acc atc tat cag 1110  
 Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln

345

350

355

360

aac tac cag cgt atc cga atc cag gag agt cca ggc aaa gtg gcg gct 1158  
 Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala

365

370

375

cgg cgg ctg ccc cgc tcc aag gac gcc att ctc ctc gca gat ctg gtg 1206  
 Arg Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val

380

385

390

gac agc tgc aac gca gga gac gag ata gag ctg act ggc atc tat cac 1254  
 Asp Ser Cys Asn Ala Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His

395

400

405

aac aac tat gat ggc tcc ctc aac act gcc aat ggc ttc cct gtc ttt 1302  
 Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe

410

415

420

gcc act gtc atc cta gcc aac cac gtg gcc aag aag gac aac aag gtt 1350  
 Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val

425

430

435

440

gct gta ggg gaa ctg acc gat gaa gat gtg aag atg atc act agc ctc 1398  
 Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu  
 445 450 455

tcc aag gat cag cag atc gga gag aag atc ttt gcc agc att gct cct 1446  
 Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro  
 460 465 470

tcc atc tat ggt cat gaa gac atc aag aga ggc cct gct ctg gcc ctg 1494  
 Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Pro Ala Leu Ala Leu  
 475 480 485

ttc gga ggg gag ccc aaa aac cca ggt ggc aag cac aag gta cgt ggt 1542  
 Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly  
 490 495 500

gat atc aac gtg ctc ttg tgc gga gac cct ggc aca gcg aag tcg cag 1590  
 Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln  
 505 510 515 520

ttt ctc aag tat att gag aaa gtg tcc agc cga gcc atc ttc acc act 1638  
 Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr  
 525 530 535

ggc cag ggg gcg tcg gct gtg gcc gtc acg gcg tat gtc cag cgg cac 1686  
 Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Ala Val Thr Ala Tyr Val Gln Arg His  
 540 545 550

cct gtc agc agg gag tgg acc ttg gag gct ggg gcc ctg gtt ctg gct 1734

Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala

.555

560

565

gac cga gga gtg tgt ctc att gat gaa ttt gac aag atg aat gac cag 1782

Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln

570

575

580

gac aga acc agc atc cat gag gcc atg gag caa cag agc atc tcc atc 1830

Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile

585

590

595

600

tcg aag gct ggc atc gtc acc tcc ctg cag gct cgc tgc acg gtc att 1878

Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile

605

610

615

gct gcc gcc aac ccc ata gga ggg cgc tac gac ccc tcg ctg act ttc 1926

Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe

620

625

630

tct gag aac gtg gac ctc aca gag ccc atc atc tca cgc ttt gac atc 1974

Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile

635

640

645

ctg tgt gtg gtg agg gac acc gtg gac cca gtc cag gac gag atg ctg 2022

Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu

650

655

660

gcc cgc ttc gtg gtg ggc agc cac gtc aga cac cac ccc agc aac aag 2070

Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys

665

670

675

680

gag gag gag ggg ctg gcc aat ggc agc gct gct gag ccc gcc atg ccc 2118

Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro

685

690

695

aac acg tat ggc gtg gag ccc ctg ccc cag gag gtc ctg aag aag tac 2166

Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr

700

705

710

atc atc tac gcc aag gag agg gtc cac ccg aag ctc aac cag atg gac 2214

Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp

715

720

725

cag gac aag gtg gcc aag atg tac agt gac ctg agg aaa gaa tct atg 2262

Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met

730

735

740

gcg aca ggc agc atc ccc att acg gtg cgg cac atc gag tcc atg agt 2310

Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu Ser Met Ser

745

750

755

760

cat ggc gga ggc cca cgc gcg cat cca tct gcg gga cta tgt gat cga 2358

His Gly Gly Gly Pro Arg Ala His Pro Ser Ala Gly Leu Cys Asp Arg

765

770

775

aga cga cgt caa cat ggc cat ccg cgt gat gct gga gag ctt cat aga 2406

Arg Arg Arg Gln His Gly His Pro Arg Asp Ala Gly Glu Leu His Arg

780

785

790

cac aca gaa gtt cag cgt cat cgc agc atg cgc aag act ttt gcc cgc 2454

His Thr Glu Val Gln Arg His Arg Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg

795

800

805

tac ctt tca ttc cgg cgt gac aac aat gag ctg ttg ctc ttc ata ctg 2502

Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu

810

815

820

aag cag tta gtg gca gag cag gtg aca tat cag cgc aac cgc ttt ggg 2550

Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly

825

830

835

840

gcc cag cag gac act att gag gtc cct gag aag gac ttg gtg gat aag 2598

Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys

845

850

855

gct cgt cag atc aac atc cac aac ctc tct gca ttt tat gac agt gag 2646

Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu

860

865

870

ctc ttc agg atg aac aag ttc agc cac gac ctg aaa agg aaa atg atc 2694

Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile

875

880

885

ctg cag cag ttc tga ggccctatgc catccataag gattccttgg gattctggtt 2749

Leu Gln Gln Phe

890

tggggtggtc agtgccctct gtgctttatg gacacaaaac cagagcactt gatgaactcg 2809  
 ggggtactagg gtcagggcctt atagcaggat gtctggctgc acctggcatg actgtttgtt 2869  
 tctccaagcc tgctttgtgc ttctcacctt tgggtgggat gccttgccag tgtgtcttac 2929  
 ttggttgctg aacatcttgc cacctccgag tgctttgtct ccactcagta ccttggatca 2989  
 gagctgctga gttcaggatg cctgcgtgtg gtttaggtgt tagccttctt acatggatgt 3049  
 caggagagct gctgccctct tggcgtgagt tgcgtattca ggctgctttt gctcgctttg 3109  
 gccagagagc tggttgaaga tgtttgtaat cgttttcagt ctctgcagg tttctgtgcc 3169  
 cctgtgggtgg aagaggcacg acagtgccag cgcagcgttc tgggctcctc agtcgcaggg 3229  
 gtgggatgtg agtcatgagg attatccact cgccacagtt atcagctgcc attgtccct 3289  
 gtctgtttcc ccactctctt atttgtgcat tcggtttggt ttctgtagtt ttaattttta 3349  
 ataaagttga ataaaatata aaaaaaaaaa 3379

<210> 3

<211> 892

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu  
 35 40 45  
 Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile  
 50 55 60  
 Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala  
 65 70 75 80

Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu

85

90

95

Thr Ala Ser Arg Arg Glu Ala Ala Asp Gly Pro Cys Gly Thr Val Thr

100

105

110

Gly Ser Trp Pro Gly Leu Gly Ala Cys Ala Val Gly Ser Cys Met Thr

115

120

125

Ala Met Arg Arg Thr Arg Ser Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Ser Gly

130

135

140

Ala Gly Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Gln Met Ile Glu Ser Ile

145

150

155

160

Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser

165

170

175

Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu

180

185

190

Arg Thr His Val Asp Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile

195

200

205

Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu

210

215

220

Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala

225

230

235

240

Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val

245

250

255

Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val

260

265

270

Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln

275

280

285

Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys

290

295

300

Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys

305	310	315	320
Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val			
325	330	335	
Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val			
340	345	350	
Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln			
355	360	365	
Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Arg Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp			
370	375	380	
Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Asn Ala Gly Asp Glu			
385	390	395	400
Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn			
405	410	415	
Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His			
420	425	430	
Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu			
435	440	445	
Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu			
450	455	460	
Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile			
465	470	475	480
Lys Arg Gly Pro Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro			
485	490	495	
Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly			
500	505	510	
Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val			
515	520	525	
Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Ala			
530	535	540	

Val Thr Ala Tyr Val Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu  
 545                      550                      555                      560  
 Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp  
                     565                      570                      575  
 Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala  
                     580                      585                      590  
 Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser  
                     595                      600                      605  
 Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly  
                     610                      615                      620  
 Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu  
 625                      630                      635                      640  
 Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val  
                     645                      650                      655  
 Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His  
                     660                      665                      670  
 Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly  
                     675                      680                      685  
 Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu  
                     690                      695                      700  
 Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val  
 705                      710                      715                      720  
 His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr  
                     725                      730                      735  
 Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr  
                     740                      745                      750  
 Val Arg His Ile Glu Ser Met Ser His Gly Gly Gly Pro Arg Ala His  
                     755                      760                      765  
 Pro Ser Ala Gly Leu Cys Asp Arg Arg Arg Gln His Gly His Pro

770

775

780

Arg Asp Ala Gly Glu Leu His Arg His Thr Glu Val Gln Arg His Arg

785

790

795

800

Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn

805

810

815

Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val

820

825

830

Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val

835

840

845

Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn

850

855

860

Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser

865

870

875

880

His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe

885

890

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2715

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2715)

&lt;400&gt; 4

atg gcg gag tct tct gag tct ctc tca gca tct agc cct gcc cgt cag 48

Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Leu Ser Ala Ser Ser Pro Ala Arg Gln

1

5

10

15

cgg cgc cgg atc agt gat ccc ctc acc tcc agc cca ggc cgc agc tcc 96

Arg Arg Arg Ile Ser Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser

20

25

30

aga cgt gct gac gcc ctg acc tcc agc cct ggc aga gac ctc ccc cca 144

Arg Arg Ala Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro

35

40

45

ttt gaa gat gag tct gag ggg ctt ctg ggc aca gag ggg ccc atg gag 192

Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Met Glu

50

55

60

gaa gaa gag gat gga gag gaa ctc att ggt gat ggc atg gag aga gac 240

Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp

65

70

75

80

tac cgt ccc att ccg gag ctc gat gtc tac gag gcc gag gga ttg gcc 288

Tyr Arg Pro Ile Pro Glu Leu Asp Val Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala

85

90

95

ctg gat gat gaa gat gtg gag gag ctg aca gcc agt cag aga gag gca 336

Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala

100

105

110

gct gag cgg acc atg agg cag cgg gac cgt gag gct ggc aga ggc ctg 384

Ala Glu Arg Thr Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu

115

120

125

gga cgc atg cgc cgg ggg ctg ctc tat gac agc agc gag gaa gat gag 432  
 Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Asp Glu

130

135

140

gag cgg cct gcc cgt aag cgc cgc cac gta gaa cgc gcc aca gag gat 480  
 Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg His Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp

145

150

155

160

ggc gag gag gat gaa gag atg atc gag agt att gag aat ctg gag gac 528  
 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp

165

170

175

ctc aag ggc cac tcg gtg cgc gag cgg gtg agc atg gca ggg ccc agg 576  
 Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Arg Val Ser Met Ala Gly Pro Arg

180

185

190

ctg gag atc cac cac cgc ttc aag aac ttc ctg cgc acc cac gtg gac 624  
 Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp

195

200

205

agc cat ggc cac aac gtc ttc aag gag cgc atc agt gat atg tgc aaa 672  
 Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys

210

215

220

gag aac cgt gag agt ttg gtg gta aat tat gaa gac ctg gca gcc cgg 720  
 Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg

225

230

235

240

gag cac gtg ttg gca tac ttc ctg ccg gaa gca ccg gct gag ttg ctg 768  
 Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu  
 245 250 255

cag atc ttt gac gag gct gcc ctg gag gtc gtg ttg gcc atg tac cct 816  
 Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro  
 260 265 270

aaa tat gac cgt atc acc aac cac atc cat gtg cgc atc tcc cac ctg 864  
 Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu  
 275 280 285

cct ctg gtg gag gag ctg cgt tca ctg agg cag ttg cac ctg aac cag 912  
 Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln  
 290 295 300

ctg atc cgt acc agt ggc gtg gtg acc agc tgc acc gga gtc ctg ccc 960  
 Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro  
 305 310 315 320

cag ctc agc atg gtc aag tac aac tgt agc aag tgc aac ttt gta ctg 1008  
 Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Ser Lys Cys Asn Phe Val Leu  
 325 330 335

ggg cct ttc tgc cag tct cag aat cag gag gtg aag cct ggc tcc tgc 1056  
 Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys  
 340 345 350

cct gag tgc cag tct gct ggg ccc ttt gag atc aac atg gag gag acc 1104

Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Ile Asn Met Glu Glu Thr

355

360

365

atc tat cag aac tac caa cgt atc cgc atc cag gag agt ccc ggc aag 1152

Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys

370

375

380

gtg gcg gct ggc cga ctg ccc cgt tcc aag gat gcc att ctc ctc gct 1200

Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala

385

390

395

400

gat ctg gtg gac agc tgc aag cca ggg gac gag att gag ctg acc ggc 1248

Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly

405

410

415

att tac cat aat aac tat gac ggc tcg ctt aac acc gcc aac ggc ttt 1296

Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe

420

425

430

cca gtc ttt gcc act att atc ttg gcc aac cat gtt gcc aag aag gac 1344

Pro Val Phe Ala Thr Ile Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp

435

440

445

aac aaa gta gct gtg ggg gag ctc acc gat gag gac gtg aag atg atc 1392

Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile

450

455

460

acc ggt ctc tcc aag gat cag caa att gga gag aag atc ttt gcc agc 1440

Thr Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser

465

470

475

480

att gca ccc tcc atc tat ggg cat gaa gac atc aag aga ggc ctg gct 1488

Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala

485

490

495

ctg gcc ctg ttt gga ggg gag ccc aag aac cca ggt gga aag cac aag 1536

Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys

500

505

510

gtt cga ggt gac att aat gtg ctc ttg tgt ggg gac cct ggc aca gca 1584

Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala

515

520

525

aag tcc caa ttc ctc aaa tac atc gag aaa gtg tct agc cgt gcc atc 1632

Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile

530

535

540

ttc acc act ggc cag ggt gcg tca gca gtg ggt ctc acc gcg tac gtt 1680

Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val

545

550

555

560

cag cgg cat ccc gtc agc aga gag tgg acc tta gag gcg gga gcc ctg 1728

Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu

565

570

575

gtt ctg gct gac cgg ggg gtg tgt ctc att gac gag ttt gac aag atg 1776

Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met

580

585

590

aat gac cag gac agg acc agc atc cac gag gcc atg gaa cag caa agc 1824

Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser

595

600

605

atc tcc atc tcc aag gct ggc atc gtt acc tcg ctg caa gcc cgc tgc 1872

Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys

610

615

620

act gtc ata gct gct gcc aac ccc ata gga ggc cgc tac gac cct tca 1920

Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser

625

630

635

640

ctg acc ttc tca gag aat gta gac ctc aca gag ccc atc att tcc cgc 1968

Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg

645

650

655

ttt gat gtc ctg tgt gtg gtg agg gac act gtt gat cca gtt cag gat 2016

Phe Asp Val Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp

660

665

670

gag atg ctg gcc cgc ttt gtg gtt ggc agc cac gtc aga cac cac ccc 2064

Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro

675

680

685

agt aac aag aag gat gaa ggg ttg act aat ggt ggc acc ttg gag cca 2112

Ser Asn Lys Lys Asp Glu Gly Leu Thr Asn Gly Gly Thr Leu Glu Pro

690

695

700

gcc atg ccc aac aca tat ggc gtg gag ccc ctg cct cag gag gtg ctg 2160

Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu

705 710 715 720

aag aag tat atc atc tat gcc aag gag agg gtc cgc ccg aag ctc aac 2208

Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val Arg Pro Lys Leu Asn

725 730 735

cag atg gac cag gat aaa gtg gcc agg atg tac agt gac ctg agg aag 2256

Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Arg Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys

740 745 750

gag tcc atg gca acg ggc agc att ccc atc acg gtg cgc cac atc gag 2304

Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu

755 760 765

tcc atg atc cgc atg gcc gag gcc cat gcc cgc atg cac ctg cgg gac 2352

Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Met His Leu Arg Asp

770 775 780

tac gtg atg gaa gac gat gtc aac atg gcc atc cga gtg atg atg gag 2400

Tyr Val Met Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Met Glu

785 790 795 800

agc ttc att gac acc cag aag ttc agc gtc atg cgg agt atg cgc aag 2448

Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys

805 810 815

act ttt gcc cgg tat ctc tcc ttc cgg cga gat aac aat gat ctg ctg 2496

Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Asp Leu Leu  
820 825 830

ctc ttc ata ctg aag cag ttg gtg gct gag cag gtg aca tat caa cgc 2544  
Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg  
835 840 845

aac cgc ttt ggg gcc cag cag gac acc att gaa ata cct gag aag gat 2592  
Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Ile Pro Glu Lys Asp  
850 855 860

ctg atg gac aag gcc agg cag atc aat att cac aac ctc tct gcc ttc 2640  
Leu Met Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe  
865 870 875 880

tac gac agc gac ctc ttc aaa ttc aac aag ttc agc cgt gac ctg aaa 2688  
Tyr Asp Ser Asp Leu Phe Lys Phe Asn Lys Phe Ser Arg Asp Leu Lys  
885 890 895

cgc aaa ctg atc cta cag cag ttc tga 2715  
Arg Lys Leu Ile Leu Gln Gln Phe  
900 905

<210> 5

<211> 904

<212> PRT

<213> Mus musculus

&lt;400&gt; 5

Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Leu Ser Ala Ser Ser Pro Ala Arg Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Arg Ile Ser Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser  
 20 25 30  
 Arg Arg Ala Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro  
 35 40 45  
 Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Met Glu  
 50 55 60  
 Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp  
 65 70 75 80  
 Tyr Arg Pro Ile Pro Glu Leu Asp Val Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala  
 85 90 95  
 Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala  
 100 105 110  
 Ala Glu Arg Thr Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu  
 115 120 125  
 Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Ser Glu Glu Asp Glu  
 130 135 140  
 Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg His Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp  
 165 170 175  
 Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Arg Val Ser Met Ala Gly Pro Arg  
 180 185 190  
 Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp  
 195 200 205  
 Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys  
 210 215 220

Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg  
 225                      230                      235                      240  
 Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu  
                     245                      250                      255  
 Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro  
                     260                      265                      270  
 Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu  
                     275                      280                      285  
 Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln  
                     290                      295                      300  
 Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Ser Lys Cys Asn Phe Val Leu  
                     325                      330                      335  
 Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys  
                     340                      345                      350  
 Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Ile Asn Met Glu Glu Thr  
                     355                      360                      365  
 Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys  
                     370                      375                      380  
 Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala  
 385                      390                      395                      400  
 Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly  
                     405                      410                      415  
 Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe  
                     420                      425                      430  
 Pro Val Phe Ala Thr Ile Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp  
                     435                      440                      445  
 Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile

450                      455                      460  
 Thr Gly Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala  
                     485                      490                      495  
 Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys  
                     500                      505                      510  
 Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala  
                     515                      520                      525  
 Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile  
                     530                      535                      540  
 Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val  
 545                      550                      555                      560  
 Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu  
                     565                      570                      575  
 Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met  
                     580                      585                      590  
 Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser  
                     595                      600                      605  
 Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys  
                     610                      615                      620  
 Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser  
 625                      630                      635                      640  
 Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg  
                     645                      650                      655  
 Phe Asp Val Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp  
                     660                      665                      670  
 Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro  
                     675                      680                      685

Ser Asn Lys Lys Asp Glu Gly Leu Thr Asn Gly Gly Thr Leu Glu Pro  
 690 695 700  
 Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu  
 705 710 715 720  
 Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val Arg Pro Lys Leu Asn  
 725 730 735  
 Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Arg Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys  
 740 745 750  
 Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu  
 755 760 765  
 Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Met His Leu Arg Asp  
 770 775 780  
 Tyr Val Met Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Met Glu  
 785 790 795 800  
 Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys  
 805 810 815  
 Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Asp Leu Leu  
 820 825 830  
 Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg  
 835 840 845  
 Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Ile Pro Glu Lys Asp  
 850 855 860  
 Leu Met Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe  
 865 870 875 880  
 Tyr Asp Ser Asp Leu Phe Lys Phe Asn Lys Phe Ser Arg Asp Leu Lys  
 885 890 895  
 Arg Lys Leu Ile Leu Gln Gln Phe  
 900

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 3187

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (133)..(1857)

&lt;400&gt; 6

gaattcggca cgagttggag acggcgaccc aggcattctgg ggagcacaga agtcgtactc 60  
 ccttaaacc ctcgtttgctc cccctgtgga tgtaaccct tagctggcat ttgcatctc 120

aattggcttg tg atg gag gcg tct ttg ggg att cag atg gat gag cca atg 171

Met Glu Ala Ser Leu Gly Ile Gln Met Asp Glu Pro Met

1

5

10

gct ttt tct ccc cag cgt gac cgg ttt cag gct gaa ggc tct tta aaa 219

Ala Phe Ser Pro Gln Arg Asp Arg Phe Gln Ala Glu Gly Ser Leu Lys

15

20

25

aaa aac gag cag aat ttt aaa ctt gca ggt gtt aaa aaa gat att gag 267

Lys Asn Glu Gln Asn Phe Lys Leu Ala Gly Val Lys Lys Asp Ile Glu

30

35

40

45

aag ctt tat gaa gct gta cca cag ctt agt aat gtg ttt aag att gag 315

Lys Leu Tyr Glu Ala Val Pro Gln Leu Ser Asn Val Phe Lys Ile Glu

50

55

60

gac aaa att gga gaa ggc act ttc agc tct gtt tat ttg gcc aca gca 363  
Asp Lys Ile Gly Glu Gly Thr Phe Ser Ser Val Tyr Leu Ala Thr Ala

65

70

75

cag tta caa gta gga cct gaa gag aaa att gct cta aaa cac ttg att 411  
Gln Leu Gln Val Gly Pro Glu Glu Lys Ile Ala Leu Lys His Leu Ile

80

85

90

cca aca agt cat cct ata aga att gca gct gaa ctt cag tgc cta aca 459  
Pro Thr Ser His Pro Ile Arg Ile Ala Ala Glu Leu Gln Cys Leu Thr

95

100

105

gtg gct ggg ggg caa gat aat gtc atg gga gtt aaa tac tgc ttt agg 507  
Val Ala Gly Gly Gln Asp Asn Val Met Gly Val Lys Tyr Cys Phe Arg  
110 115 120 125

aag aat gat cat gta gtt att gct atg cca tat ctg gag cat gag tcg 555  
Lys Asn Asp His Val Val Ile Ala Met Pro Tyr Leu Glu His Glu Ser

130

135

140

ttt ttg gac att ctg aat tct ctt tcc ttt caa gaa gta cgg gaa tat 603  
Phe Leu Asp Ile Leu Asn Ser Leu Ser Phe Gln Glu Val Arg Glu Tyr

145

150

155

atg ctt aat ctg ttc aaa gct ttg aaa cgc att cat cag ttt ggt att 651  
Met Leu Asn Leu Phe Lys Ala Leu Lys Arg Ile His Gln Phe Gly Ile

160

165

170

gtt cac cgt gat gtt aag ccc agc aat ttt tta tat aat agg cgc ctg 699

Val His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Phe Leu Tyr Asn Arg Arg Leu

175

180

185

aaa aag tat gcc ttg gta gac ttt ggt ttg gcc caa gga acc cat gat 747

Lys Lys Tyr Ala Leu Val Asp Phe Gly Leu Ala Gln Gly Thr His Asp

190

195

200

205

acg aaa ata gag ctt ctt aaa ttt gtc cag tct gaa gct cag cag gaa 795

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Lys Phe Val Gln Ser Glu Ala Gln Gln Glu

210

215

220

agg tgt tca caa aac aaa tcc cac ata atc aca gga aac aag att cca 843

Arg Cys Ser Gln Asn Lys Ser His Ile Ile Thr Gly Asn Lys Ile Pro

225

230

235

ctg agt ggc cca gta cct aag gag ctg gat cag cag tcc acc aca aaa 891

Leu Ser Gly Pro Val Pro Lys Glu Leu Asp Gln Gln Ser Thr Thr Lys

240

245

250

gct tct gtt aaa aga ccc tac aca aat gca caa att cag att aaa caa 939

Ala Ser Val Lys Arg Pro Tyr Thr Asn Ala Gln Ile Gln Ile Lys Gln

255

260

265

gga aaa gac gga aag gag gga tct gta ggc ctt tct gtc cag cgc tct 987

Gly Lys Asp Gly Lys Glu Gly Ser Val Gly Leu Ser Val Gln Arg Ser

270

275

280

285

gtt ttt gga gaa aga aat ttc aat ata cac agc tcc att tca cat gag 1035

Val Phe Gly Glu Arg Asn Phe Asn Ile His Ser Ser Ile Ser His Glu

290

295

300

agc cct gca gtg aaa ctc atg aag cag tca aag act gtg gat gta ctg 1083

Ser Pro Ala Val Lys Leu Met Lys Gln Ser Lys Thr Val Asp Val Leu

305

310

315

tct aga aag tta gca aca aaa aag aag gct att tct acg aaa gtt atg 1131

Ser Arg Lys Leu Ala Thr Lys Lys Lys Ala Ile Ser Thr Lys Val Met

320

325

330

aat agt gct gtg atg agg aaa act gcc agt tct tgc cca gct agc ctg 1179

Asn Ser Ala Val Met Arg Lys Thr Ala Ser Ser Cys Pro Ala Ser Leu

335

340

345

acc tgt gac tgc tat gca aca gat aaa gtt tgt agt att tgc ctt tca 1227

Thr Cys Asp Cys Tyr Ala Thr Asp Lys Val Cys Ser Ile Cys Leu Ser

350

355

360

365

agg cgt cag cag gtt gcc cct agg gca ggt aca cca gga ttc aga gca 1275

Arg Arg Gln Gln Val Ala Pro Arg Ala Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala

370

375

380

cca gag gtc ttg aca aag tgc ccc aat caa act aca gca att gac atg 1323

Pro Glu Val Leu Thr Lys Cys Pro Asn Gln Thr Thr Ala Ile Asp Met

385

390

395

tgg tct gca ggt gtc ata ttt ctt tct ttg ctt agt gga cga tat cca 1371

Trp Ser Ala Gly Val Ile Phe Leu Ser Leu Leu Ser Gly Arg Tyr Pro

400

405

410

ttt tat aaa gca agt gat gat tta act gct ttg gcc caa att atg aca 1419

Phe Tyr Lys Ala Ser Asp Asp Leu Thr Ala Leu Ala Gln Ile Met Thr

415

420

425

att agg gga tcc aga gaa act atc caa gct gct aaa act ttt ggg aaa 1467

Ile Arg Gly Ser Arg Glu Thr Ile Gln Ala Ala Lys Thr Phe Gly Lys

430

435

440

445

tca ata tta tgt agc aaa gaa gtt cca gca caa gac ttg aga aaa ctc 1515

Ser Ile Leu Cys Ser Lys Glu Val Pro Ala Gln Asp Leu Arg Lys Leu

450

455

460

tgt gag aga ctc agg ggt atg gat tct agc act ccc aag tta aca agt 1563

Cys Glu Arg Leu Arg Gly Met Asp Ser Ser Thr Pro Lys Leu Thr Ser

465

470

475

gat ata caa ggg cat gct tct cat caa cca gct att tca gag aag act 1611

Asp Ile Gln Gly His Ala Ser His Gln Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr

480

485

490

gac cat aaa gct tct tgc ctc gtt caa aca cct cca gga caa tac tca 1659

Asp His Lys Ala Ser Cys Leu Val Gln Thr Pro Pro Gly Gln Tyr Ser

495

500

505

ggg aat tca ttt aaa aag ggg gat agt aat agc tgt gag cat tgt ttt 1707

Gly Asn Ser Phe Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Cys Glu His Cys Phe

510

515

520

525

gat gag tat aat acc aat tta gaa ggc tgg aat gag gta cct gat gaa 1755

Asp Glu Tyr Asn Thr Asn Leu Glu Gly Trp Asn Glu Val Pro Asp Glu

530

535

540

gct tat gac ctg ctt gat aaa ctt cta gat cta aat cca gct tca aga 1803

Ala Tyr Asp Leu Leu Asp Lys Leu Leu Asp Leu Asn Pro Ala Ser Arg

545

550

555

ata aca gca gaa gaa gct ttg ttg cat cca ttt ttt aaa gat atg agc 1851

Ile Thr Ala Glu Glu Ala Leu Leu His Pro Phe Phe Lys Asp Met Ser

560

565

570

ttg tga taatggatct tcatttaatg tttactgtta tgaggtagaa taaaaaagaa 1907

Leu

575

tactttgtaa tagccacaag ttcttggtta gagaccagag caggattaat aatttatttt 1967

aacatttttag tgtttggtgg cacatttctaa aatatagatt aagaatactt aaaatgcctg 2027

ggatagttct tgggactaac aacatgatct tctttgagtt aaacctacct aagtagattt 2087

taggtgggtt cctattaggt cagattttta gcttccctaa ttacctttca ctgacatata 2147

cagaaaaagg agcagtttta gttttaatta attaaaatta acagatgtga tgaggattaa 2207

atgaatcaaa agacttaatt thtagattct tttagagtta tgagctaggt atagtttggg 2267

gaaactcaac ctggtgctgg tgctcttaac aattttgtaa ataaagaaga taatttcctt 2327

ttctagaggt acatattagg ccttttatga acactaaaac aatgaggaaa tgtttggtcat 2387

ggggcaaagt atcacttaaa attgaattca tccattttta aaaaacactt catgaaagca 2447

ttctggtgtg aattgccatt ttttcttac tggcttctca attttcttcc ttctctgccc 2507

ctacctaaaa cattctcctc ggaaattaca tgggtgctgac cacaaagttt ctggatgttt 2567

tattaaatat tgtacgtctt tacagttggg aatttaaaat aatacatata ctggttgata 2627

aagggaagct gcaggaccaa ggtgaagatt gatagtcгаа atgcttttct tttttgagtt 2687  
gtatatTTTT ggacaccatc ttagatataa ttaggtagct gctgaaagga aaagtgaata 2747  
cagaattgac ggtattattg gagatttttc ctctgcgtag agccatccag atctctgtat 2807  
cctgttttga ctaagtctta ggtgggttgg gaagacagat aatgaagtgt aggcaaagag 2867  
aaaaggaccc aagatagagg tttatattca gaaatggat atatcaatga cagcatatca 2927  
aacttctat gggaaaaagt ctggtgggtg gtcagctgac agatttcca tttagtagtc 2987  
atagaataca gaaatagttt agggacatgt attcattttg ttattttgag cattgatagg 3047  
tcagtatatc tacctaattc gtttggttaag tataggatat ataaaccatt accattgatc 3107  
tgtcttatgc cataatctta aaaaaaaatt gaatgctctt gaatttgtat attcaataaa 3167  
gttatccttt tatatTTTT 3187

<210> 7

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met	Glu	Ala	Ser	Leu	Gly	Ile	Gln	Met	Asp	Glu	Pro	Met	Ala	Phe	Ser
1				5				10					15		
Pro	Gln	Arg	Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	Lys	Lys	Asn	Glu
			20					25					30		
Gln	Asn	Phe	Lys	Leu	Ala	Gly	Val	Lys	Lys	Asp	Ile	Glu	Lys	Leu	Tyr
		35					40					45			
Glu	Ala	Val	Pro	Gln	Leu	Ser	Asn	Val	Phe	Lys	Ile	Glu	Asp	Lys	Ile
		50				55					60				
Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Gln	Leu	Gln
	65				70					75				80	
Val	Gly	Pro	Glu	Glu	Lys	Ile	Ala	Leu	Lys	His	Leu	Ile	Pro	Thr	Ser

85	90	95
His Pro Ile Arg Ile Ala Ala Glu Leu Gln Cys Leu Thr Val Ala Gly		
100	105	110
Gly Gln Asp Asn Val Met Gly Val Lys Tyr Cys Phe Arg Lys Asn Asp		
115	120	125
His Val Val Ile Ala Met Pro Tyr Leu Glu His Glu Ser Phe Leu Asp		
130	135	140
Ile Leu Asn Ser Leu Ser Phe Gln Glu Val Arg Glu Tyr Met Leu Asn		
145	150	155
Leu Phe Lys Ala Leu Lys Arg Ile His Gln Phe Gly Ile Val His Arg		
165	170	175
Asp Val Lys Pro Ser Asn Phe Leu Tyr Asn Arg Arg Leu Lys Lys Tyr		
180	185	190
Ala Leu Val Asp Phe Gly Leu Ala Gln Gly Thr His Asp Thr Lys Ile		
195	200	205
Glu Leu Leu Lys Phe Val Gln Ser Glu Ala Gln Gln Glu Arg Cys Ser		
210	215	220
Gln Asn Lys Ser His Ile Ile Thr Gly Asn Lys Ile Pro Leu Ser Gly		
225	230	235
Pro Val Pro Lys Glu Leu Asp Gln Gln Ser Thr Thr Lys Ala Ser Val		
245	250	255
Lys Arg Pro Tyr Thr Asn Ala Gln Ile Gln Ile Lys Gln Gly Lys Asp		
260	265	270
Gly Lys Glu Gly Ser Val Gly Leu Ser Val Gln Arg Ser Val Phe Gly		
275	280	285
Glu Arg Asn Phe Asn Ile His Ser Ser Ile Ser His Glu Ser Pro Ala		
290	295	300
Val Lys Leu Met Lys Gln Ser Lys Thr Val Asp Val Leu Ser Arg Lys		
305	310	315
		320

Leu Ala Thr Lys Lys Lys Ala Ile Ser Thr Lys Val Met Asn Ser Ala

325

330

335

Val Met Arg Lys Thr Ala Ser Ser Cys Pro Ala Ser Leu Thr Cys Asp

340

345

350

Cys Tyr Ala Thr Asp Lys Val Cys Ser Ile Cys Leu Ser Arg Arg Gln

355

360

365

Gln Val Ala Pro Arg Ala Gly Thr Pro Gly Phe Arg Ala Pro Glu Val

370

375

380

Leu Thr Lys Cys Pro Asn Gln Thr Thr Ala Ile Asp Met Trp Ser Ala

385

390

395

400

Gly Val Ile Phe Leu Ser Leu Leu Ser Gly Arg Tyr Pro Phe Tyr Lys

405

410

415

Ala Ser Asp Asp Leu Thr Ala Leu Ala Gln Ile Met Thr Ile Arg Gly

420

425

430

Ser Arg Glu Thr Ile Gln Ala Ala Lys Thr Phe Gly Lys Ser Ile Leu

435

440

445

Cys Ser Lys Glu Val Pro Ala Gln Asp Leu Arg Lys Leu Cys Glu Arg

450

455

460

Leu Arg Gly Met Asp Ser Ser Thr Pro Lys Leu Thr Ser Asp Ile Gln

465

470

475

480

Gly His Ala Ser His Gln Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr Asp His Lys

485

490

495

Ala Ser Cys Leu Val Gln Thr Pro Pro Gly Gln Tyr Ser Gly Asn Ser

500

505

510

Phe Lys Lys Gly Asp Ser Asn Ser Cys Glu His Cys Phe Asp Glu Tyr

515

520

525

Asn Thr Asn Leu Glu Gly Trp Asn Glu Val Pro Asp Glu Ala Tyr Asp

530

535

540

Leu Leu Asp Lys Leu Leu Asp Leu Asn Pro Ala Ser Arg Ile Thr Ala

545

550

555

560

Glu Glu Ala Leu Leu His Pro Phe Phe Lys Asp Met Ser Leu

565

570

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 2780

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (518)..(2542)

&lt;400&gt; 8

aattcggcac gagctctctg aggctgcgcc aagacctgaa gcggcggacc gagagcccgg 60  
gtctgagact gagagagcaa cggaatggag gcggggtaga ggcggaaca caacctgcag 120  
ggccagagcg aggcgcgaga aggacggcgg cgtgaggggg cggggcgcgc agcgcgagaa 180  
ggcaggcacg aggggcgagc gcgaggcggg gcacggcgcg tggcgtgaga cggggcgggg 240  
cgcgcgatc ggcgccgcgg ccgcgtgacg cgttttcaaa tcttcaaccg ccgcagccca 300  
ctcgtttgtg ctttgcgcct tctcctccg cgccttgag ccgatccgg ccccggaac 360  
ccgacctgca gacgcgtac ctctactgcg tagaggccgt agctggcgga aggagagagg 420  
cggccgtcct gtcaacaggc cgggggaagc cgtgctttcg cggctgccg gtgcgacact 480

ttctccggac ccagcatgta ggtgccgggc gactgcc atg aac tcc gga gcc atg 535

Met Asn Ser Gly Ala Met

1

5

agg atc cac agt aaa gga cat ttc cag ggt gga atc caa gtc aaa aat 583

Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly Gly Ile Gln Val Lys Asn

10

15

20

gaa aaa aac aga cca tct ctg aaa tct ctg aaa act gat aac agg cca 631

Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu Lys Thr Asp Asn Arg Pro

25

30

35

gaa aaa tcc aaa tgt aag cca ctt tgg gga aaa gta ttt tac ctt gac 679

Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly Lys Val Phe Tyr Leu Asp

40

45

50

tta cct tct gtc acc ata tct gaa aaa ctt caa aag gac att aag gat 727

Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu Gln Lys Asp Ile Lys Asp

55

60

65

70

ctg gga ggg cga gtt gaa gaa ttt ctc agc aaa gat atc agt tat ctt 775

Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser Lys Asp Ile Ser Tyr Leu

75

80

85

att tca aat aag aag gaa gct aaa ttt gca caa acc ttg ggt cga att 823

Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala Gln Thr Leu Gly Arg Ile

90

95

100

tct cct gta cca agt cca gaa tct gca tat act gca gaa acc act tca 871

Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr Thr Ala Glu Thr Thr Ser

105

110

115

cct cat ccc agc cat gat gga agt tca ttt aag tca cca gac aca gtg 919

Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe Lys Ser Pro Asp Thr Val

120

125

130

tgt tta agc aga gga aaa tta tta gtt gaa aaa gct atc aag gac cat 967

Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu Lys Ala Ile Lys Asp His

135

140

145

150

gat ttt att cct tca aat agt ata tta tca aat gcc ttg tca tgg gga 1015

Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser Asn Ala Leu Ser Trp Gly

155

160

165

gta aaa att ctt cat att gat gac att aga tac tac att gaa caa aag 1063

Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys

170

175

180

aaa aaa gag ttg tat tta ctc aag aaa tca agt act tca gta aga gat 1111

Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser Ser Thr Ser Val Arg Asp

185

190

195

ggg ggc aaa aga gtt ggt agt ggt gca caa aaa aca aga aca gga aga 1159

Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln Lys Thr Arg Thr Gly Arg

200

205

210

ctc aaa aag cct ttt gta aag gtg gaa gat atg agc caa ctt tat agg 1207

Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp Met Ser Gln Leu Tyr Arg

215

220

225

230

cca ttt tat ctt cag ctg acc aat atg cct ttt ata aat tat tct att 1255

Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro Phe Ile Asn Tyr Ser Ile

235

240

245

特2002-067702

cag aag ccc tgc agt cca ttt gat gta gac aag cca tct agt atg caa 1303

Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp Lys Pro Ser Ser Met Gln

250

255

260

aag caa act cag gtt aaa cta aga atc caa aca gat ggc gat aag tat 1351

Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln Thr Asp Gly Asp Lys Tyr

265

270

275

ggt gga acc tca att caa ctc cag ttg aaa gag aag aag aaa aaa gga 1399

Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys Glu Lys Lys Lys Lys Gly

280

285

290

tat tgt gaa tgt tgc ttg cag aaa tat gaa gat cta gaa act cac ctt 1447

Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu Asp Leu Glu Thr His Leu

295

300

305

310

cta agt gag caa cac aga aac ttt gca cag agt aac cag tat caa gtt 1495

Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln Ser Asn Gln Tyr Gln Val

315

320

325

gtt gat gat att gta tct aag tta gtt ttt gac ttt gtg gaa tat gaa 1543

Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe Asp Phe Val Glu Tyr Glu

330

335

340

aag gac aca cct aaa aag aaa aga ata aaa tac agt gtt gga tcc ctt 1591

Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys Arg Ile Lys Tyr Ser Val Gly Ser Leu

345

350

355

tct cct gtt tct gca agt gtc ctg aaa aag act gaa caa aag gaa aaa 1639  
 Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys Thr Glu Gln Lys Glu Lys

360

365

370

gtg gaa ttg caa cat att tct cag aaa gat tgc cag gaa gat gat aca 1687  
 Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp Cys Gln Glu Asp Asp Thr

375

380

385

390

aca gtg aag gag cag aat ttc ctg tat aaa gag acc cag gaa act gaa 1735  
 Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys Glu Thr Gln Glu Thr Glu

395

400

405

aaa aag ctc ctg ttt att tca gag ccc atc ccc cac cct tca aat gaa 1783  
 Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile Pro His Pro Ser Asn Glu

410

415

420

ttg aga ggg ctt aat gag aaa atg agt aat aaa tgt tcc atg tta agt 1831  
 Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn Lys Cys Ser Met Leu Ser

425

430

435

aca gct gaa gat gac ata aga cag aat ttt aca cag cta cct cta cat 1879  
 Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe Thr Gln Leu Pro Leu His

440

445

450

aaa aac aaa cag gaa tgc att ctt gac att tcc gaa cac aca tta agt 1927  
 Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile Ser Glu His Thr Leu Ser

455

460

465

470

gaa aat gac tta gaa gaa cta agg gta gat cac tat aaa tgt aac ata 1975

Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp His Tyr Lys Cys Asn Ile  
475 480 485

cag gca tct gta cat gtt tct gat ttc agt aca gat aat agt gga tct 2023  
Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser Thr Asp Asn Ser Gly Ser  
490 495 500

caa cca aaa cag aag tca gat act gtg ctt ttt cca gca aag gat ctc 2071  
Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu Phe Pro Ala Lys Asp Leu  
505 510 515

aag gaa aag gac ctt cat tca ata ttt act cat gat tct ggt ctg ata 2119  
Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr His Asp Ser Gly Leu Ile  
520 525 530

aca ata aac agt tca caa gag cac cta act gtt cag gca aag gct cca 2167  
Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr Val Gln Ala Lys Ala Pro  
535 540 545 550

ttc cat act cct cct gag gaa ccc aat gaa tgt gac ttc aag aat atg 2215  
Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu Cys Asp Phe Lys Asn Met  
555 560 565

gat agt tta cct tct ggt aaa ata cat cga aaa gtg aaa ata ata tta 2263  
Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg Lys Val Lys Ile Ile Leu  
570 575 580

gga cga aat aga aaa gaa aat ctg gaa cca aat gct gaa ttt gat aaa 2311  
Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro Asn Ala Glu Phe Asp Lys

585

590

595

aga act gaa ttt att aca caa gaa gaa aac aga att tgt agt tca ccg 2359

Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn Arg Ile Cys Ser Ser Pro

600

605

610

gta cag tct tta cta gac ttg ttt cag act agt gaa gag aaa tca gaa 2407

Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr Ser Glu Glu Lys Ser Glu

615

620

625

630

ttt ttg ggt ttc aca agc tac aca gaa aag agt ggt ata tgc aat gtt 2455

Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys Ser Gly Ile Cys Asn Val

635

640

645

tta gat att tgg gaa gag gaa aat tca gat aat ctg tta aca gcg ttt 2503

Leu Asp Ile Trp Glu Glu Glu Asn Ser Asp Asn Leu Leu Thr Ala Phe

650

655

660

ttc tcg tcc cct tca act tct aca ttt act ggc ttt tag aatttaaaaa 2552

Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr Gly Phe

665

670

675

atgcatactt ttcagaagtg ataaggatca tattcttgaa atttttataa atatgtatgg 2612

aaattcttag gattttttta ccagctttgt ttacagaccc aaatgtaaat attaaaaata 2672

aatatttgca attttctaca gaattgaata cctgttaaag aaaaattaca gaataaactt 2732

gtgactggtc ttgttttaca ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactcgag 2780

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 674

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

Met Asn Ser Gly Ala Met Arg Ile His Ser Lys Gly His Phe Gln Gly

1 5 10 15

Gly Ile Gln Val Lys Asn Glu Lys Asn Arg Pro Ser Leu Lys Ser Leu

20 25 30

Lys Thr Asp Asn Arg Pro Glu Lys Ser Lys Cys Lys Pro Leu Trp Gly

35 40 45

Lys Val Phe Tyr Leu Asp Leu Pro Ser Val Thr Ile Ser Glu Lys Leu

50 55 60

Gln Lys Asp Ile Lys Asp Leu Gly Gly Arg Val Glu Glu Phe Leu Ser

65 70 75 80

Lys Asp Ile Ser Tyr Leu Ile Ser Asn Lys Lys Glu Ala Lys Phe Ala

85 90 95

Gln Thr Leu Gly Arg Ile Ser Pro Val Pro Ser Pro Glu Ser Ala Tyr

100 105 110

Thr Ala Glu Thr Thr Ser Pro His Pro Ser His Asp Gly Ser Ser Phe

115 120 125

Lys Ser Pro Asp Thr Val Cys Leu Ser Arg Gly Lys Leu Leu Val Glu

130 135 140

Lys Ala Ile Lys Asp His Asp Phe Ile Pro Ser Asn Ser Ile Leu Ser

145 150 155 160

Asn Ala Leu Ser Trp Gly Val Lys Ile Leu His Ile Asp Asp Ile Arg

165 170 175

Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu Lys Lys Ser

180 185 190

Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser Gly Ala Gln  
 195 200 205  
 Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys Val Glu Asp  
 210 215 220  
 Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr Asn Met Pro  
 225 230 235 240  
 Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe Asp Val Asp  
 245 250 255  
 Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu Arg Ile Gln  
 260 265 270  
 Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu Gln Leu Lys  
 275 280 285  
 Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln Lys Tyr Glu  
 290 295 300  
 Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn Phe Ala Gln  
 305 310 315 320  
 Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys Leu Val Phe  
 325 330 335  
 Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys Arg Ile Lys  
 340 345 350  
 Tyr Ser Val Gly Ser Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser Val Leu Lys Lys  
 355 360 365  
 Thr Glu Gln Lys Glu Lys Val Glu Leu Gln His Ile Ser Gln Lys Asp  
 370 375 380  
 Cys Gln Glu Asp Asp Thr Thr Val Lys Glu Gln Asn Phe Leu Tyr Lys  
 385 390 395 400  
 Glu Thr Gln Glu Thr Glu Lys Lys Leu Leu Phe Ile Ser Glu Pro Ile  
 405 410 415  
 Pro His Pro Ser Asn Glu Leu Arg Gly Leu Asn Glu Lys Met Ser Asn

420	425	430	
Lys Cys Ser Met Leu Ser Thr Ala Glu Asp Asp Ile Arg Gln Asn Phe			
435	440	445	
Thr Gln Leu Pro Leu His Lys Asn Lys Gln Glu Cys Ile Leu Asp Ile			
450	455	460	
Ser Glu His Thr Leu Ser Glu Asn Asp Leu Glu Glu Leu Arg Val Asp			
465	470	475	480
His Tyr Lys Cys Asn Ile Gln Ala Ser Val His Val Ser Asp Phe Ser			
485	490	495	
Thr Asp Asn Ser Gly Ser Gln Pro Lys Gln Lys Ser Asp Thr Val Leu			
500	505	510	
Phe Pro Ala Lys Asp Leu Lys Glu Lys Asp Leu His Ser Ile Phe Thr			
515	520	525	
His Asp Ser Gly Leu Ile Thr Ile Asn Ser Ser Gln Glu His Leu Thr			
530	535	540	
Val Gln Ala Lys Ala Pro Phe His Thr Pro Pro Glu Glu Pro Asn Glu			
545	550	555	560
Cys Asp Phe Lys Asn Met Asp Ser Leu Pro Ser Gly Lys Ile His Arg			
565	570	575	
Lys Val Lys Ile Ile Leu Gly Arg Asn Arg Lys Glu Asn Leu Glu Pro			
580	585	590	
Asn Ala Glu Phe Asp Lys Arg Thr Glu Phe Ile Thr Gln Glu Glu Asn			
595	600	605	
Arg Ile Cys Ser Ser Pro Val Gln Ser Leu Leu Asp Leu Phe Gln Thr			
610	615	620	
Ser Glu Glu Lys Ser Glu Phe Leu Gly Phe Thr Ser Tyr Thr Glu Lys			
625	630	635	640
Ser Gly Ile Cys Asn Val Leu Asp Ile Trp Glu Glu Glu Asn Ser Asp			
645	650	655	

Asn Leu Leu Thr Ala Phe Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Thr Phe Thr  
 660 665 670

Gly Phe

<210> 10

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Arg Tyr Tyr Ile Glu Gln Lys Lys Lys Glu Leu Tyr Leu Leu  
 1 5 10 15

Lys Lys Ser Ser Thr Ser Val Arg Asp Gly Gly Lys Arg Val Gly Ser  
 20 25 30

Gly Ala Gln Lys Thr Arg Thr Gly Arg Leu Lys Lys Pro Phe Val Lys  
 35 40 45

Val Glu Asp Met Ser Gln Leu Tyr Arg Pro Phe Tyr Leu Gln Leu Thr  
 50 55 60

Asn Met Pro Phe Ile Asn Tyr Ser Ile Gln Lys Pro Cys Ser Pro Phe  
 65 70 75 80

Asp Val Asp Lys Pro Ser Ser Met Gln Lys Gln Thr Gln Val Lys Leu  
 85 90 95

Arg Ile Gln Thr Asp Gly Asp Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Ile Gln Leu

100

105

110

Gln Leu Lys Glu Lys Lys Lys Lys Gly Tyr Cys Glu Cys Cys Leu Gln

115

120

125

Lys Tyr Glu Asp Leu Glu Thr His Leu Leu Ser Glu Gln His Arg Asn

130

135

140

Phe Ala Gln Ser Asn Gln Tyr Gln Val Val Asp Asp Ile Val Ser Lys

145

150

155

160

Leu Val Phe Asp Phe Val Glu Tyr Glu Lys Asp Thr Pro Lys Lys Lys

165

170

175

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 11

cccaagcttg acattagata ctacattgaa

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 12

ccggaattct ttcttttttag gtgtgtcctt

30

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:TAT sequence

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized adaptor sequence

<400> 14

aattgcggcc gc

12

<210> 15

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 15

ataagaatgc ggccgctaag aaggagatat acatatgtac ccctacgacg tg

52

<210> 16

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16

ataagaatgc ggccgcttat cacaagctca tatcttt

37

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized peptide sequence

<400> 17

Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Phe Ser Pro Gln Arg Asp

1

5

10

15

<210> 18

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 18

cacggatcca tggcatccag cccggccca

29

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

<400> 19

gtgctcgagc atcgctgtca tacaggagcc

30

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized peptide sequence

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 20

Cys Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized peptide sequence

<400> 21

Cys Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図 1】 ヒトASK、出芽酵母Dbf4、および分裂酵母Him1/Cfp1における、motif-Mとmotif-Cの配置を示した。

【図 2】 抗Mcm2-phospho-S17ポリクローナル抗体の特異性を確認した結果を示す。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸は抗体濃度(ng/ml)を示す。

【図 3】 Cdc7-ASK複合体活性物質の蛋白質リン酸化酵素活性を測定した結果を示す。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸は酵素量(μL)を示す。

【図 4】 Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応液中に添加するATPの濃度を変化させたときの反応性の変化を調べた結果を示す。図中、縦軸は2mMにおける反応性を100とする相対的活性値(%)を、横軸は反応液中のATPの終濃度(mM)を示す。

【図 5】 Cdc7-ASK複合体の活性測定方法において、リン酸化反応時間を変化させたときの反応性の変化を調べた結果を示す。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸は反応時間(分)を示す。

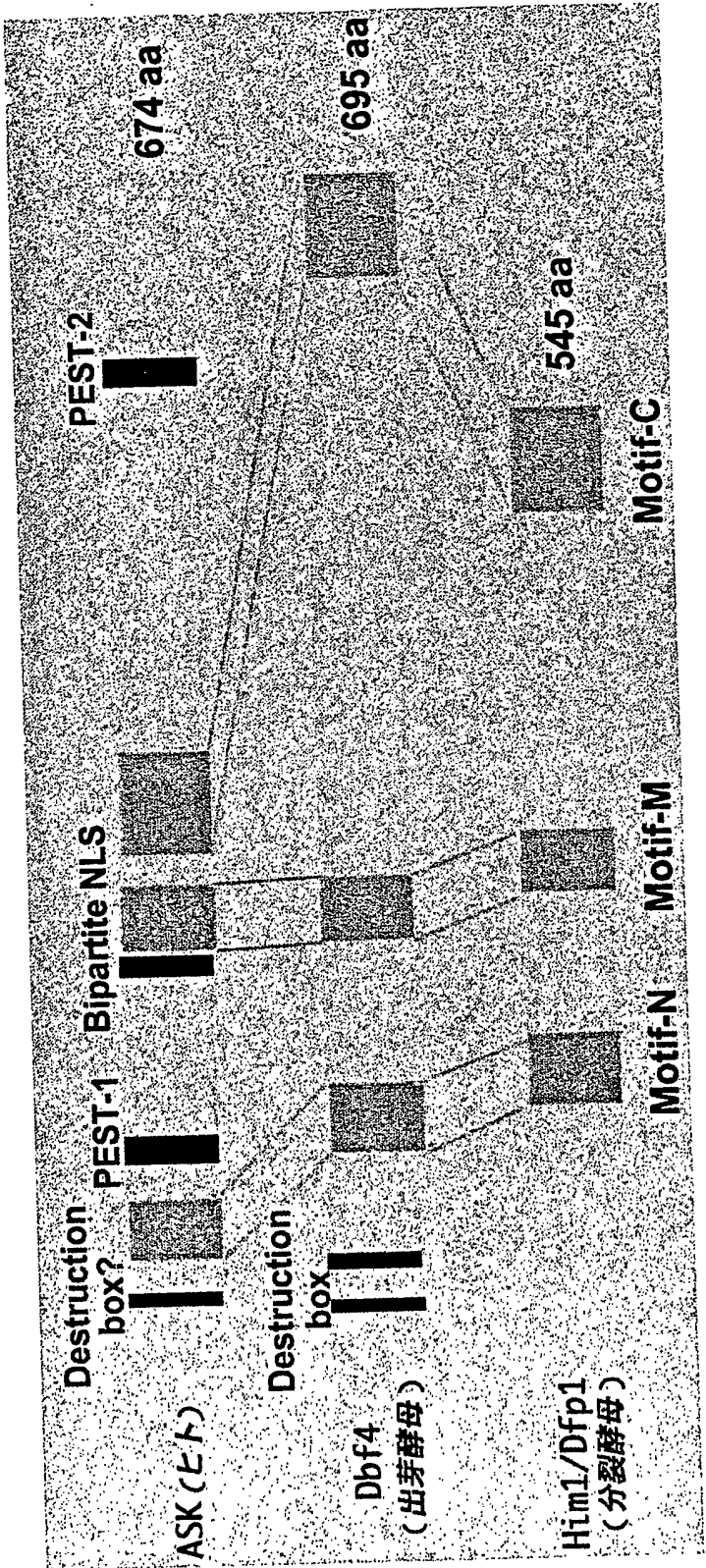
【図 6】 Cdc7-ASK複合体(野生型、WT)、および非活性型Cdc7-ASK複合体(KD)を用いた、ELISAによるリン酸化酵素活性の測定方法の評価結果を示す図。図中、縦軸は450nmにおける吸光度を、横軸は酵素量( $\mu$ L)を示す。

【図 7】 ラジオフィルターアッセイとELISA法による、リン酸化酵素活性の測定結果を示す図。図中、縦軸/左はELISAにおける測定結果(450nmにおける吸光度)を、縦軸/右はラジオフィルターアッセイにおける測定結果(放射活性;cpm)を、また横軸は酵素量( $\mu$ L)を示す。

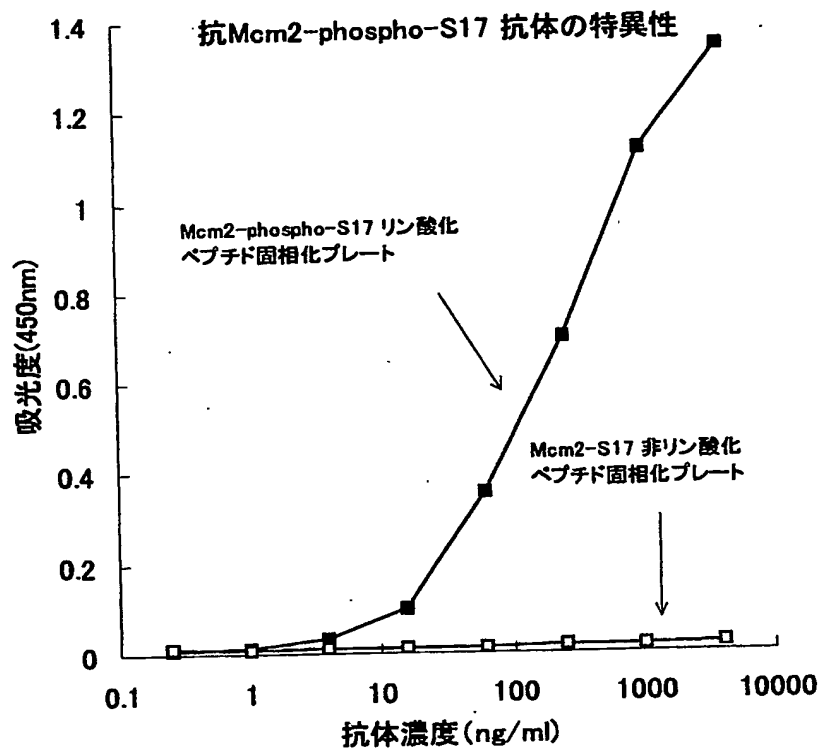
【図 8】 既知のタンパク質リン酸化阻害剤の、Cdc7-ASK複合体リン酸化活性への影響の測定結果を示す図。図中、縦軸は相対的阻害値(%)、横軸は阻害剤の濃度( $\mu$ M)を示す。

【書類名】 図面

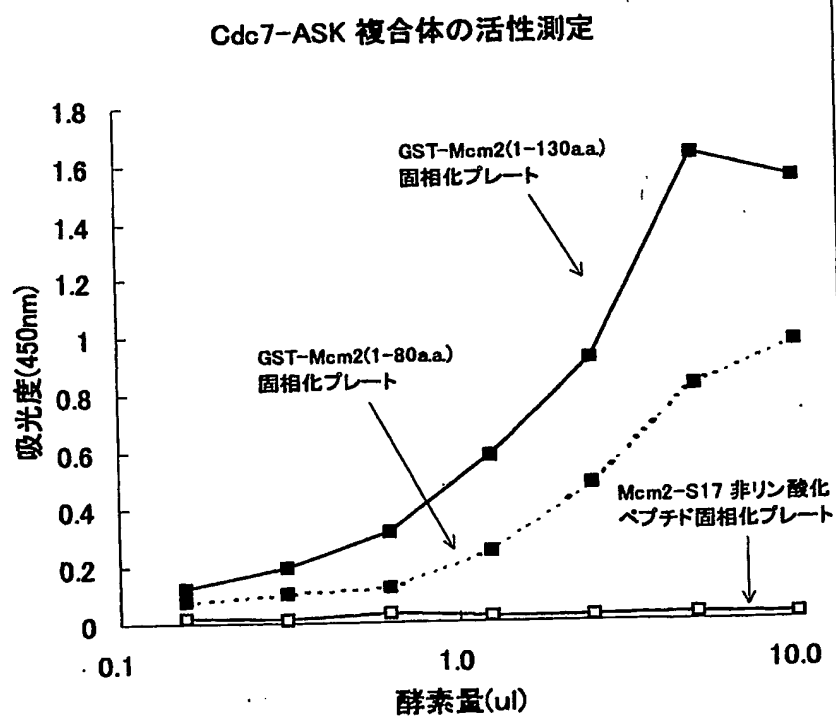
【図1】



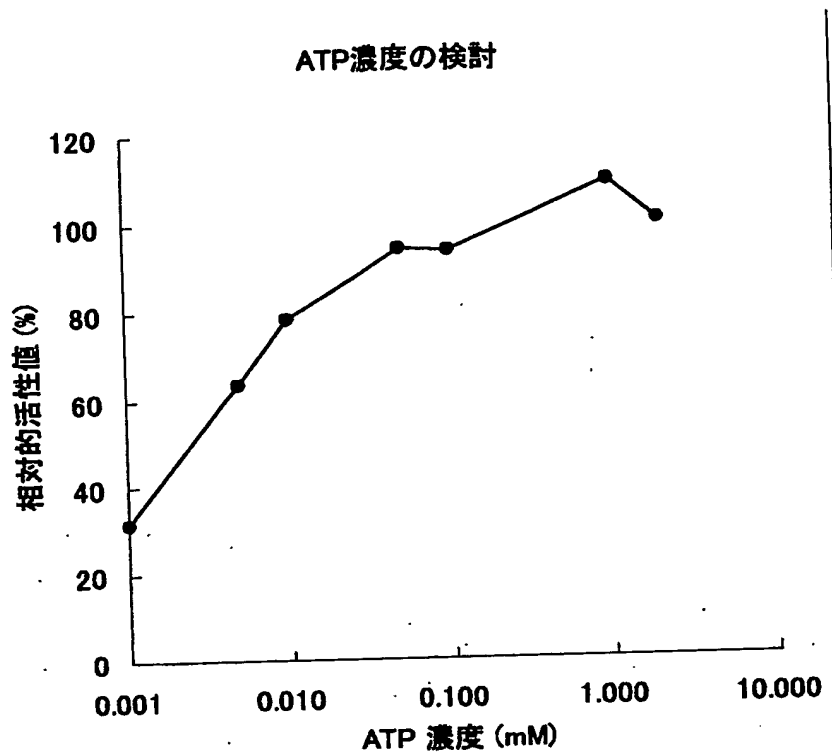
【図 2】



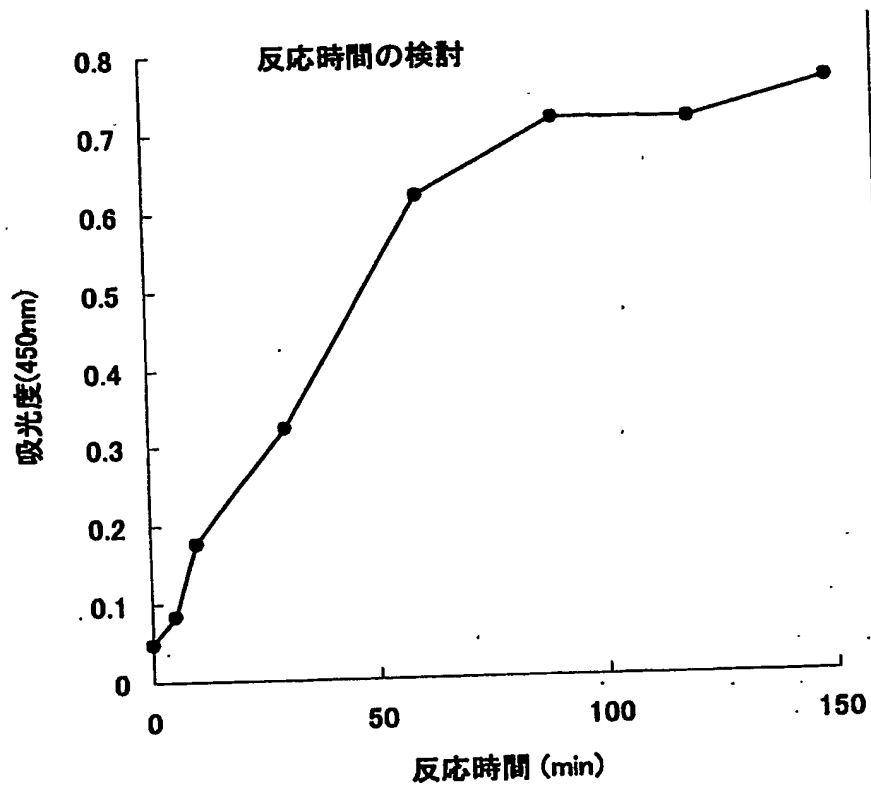
【図 3】



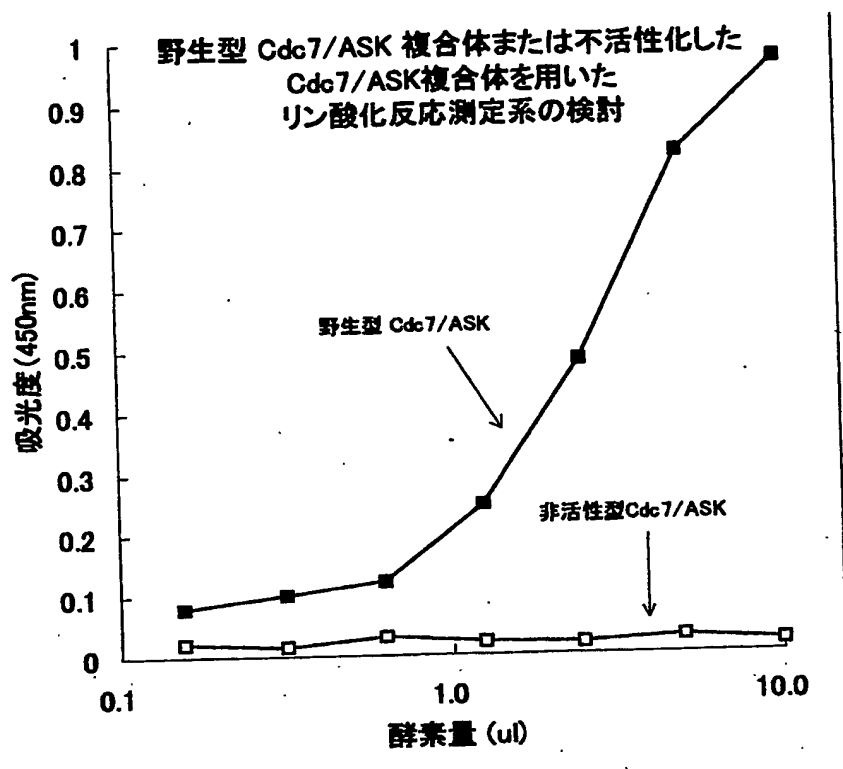
【図 4】



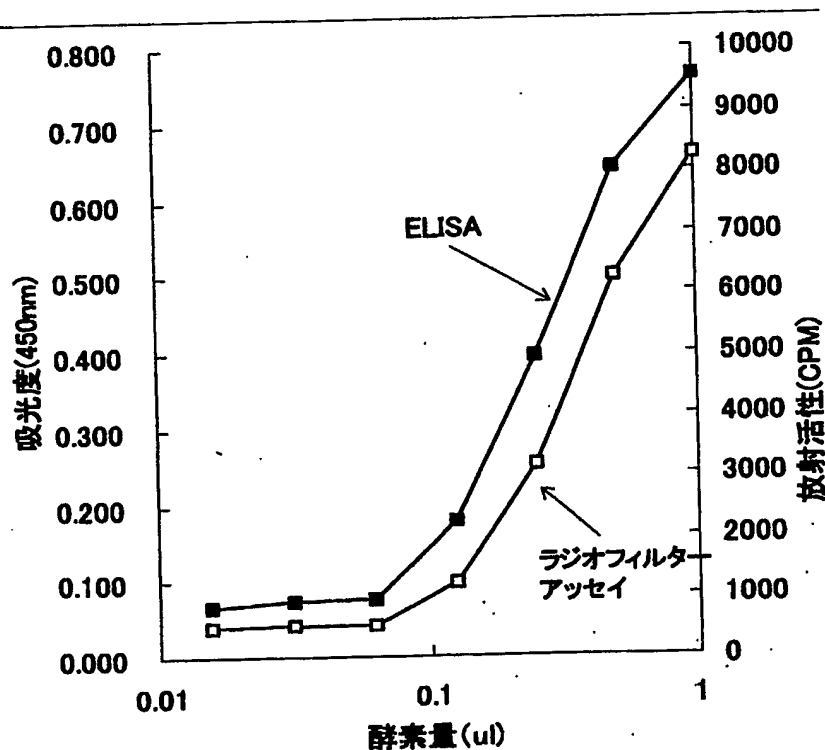
【図 5】



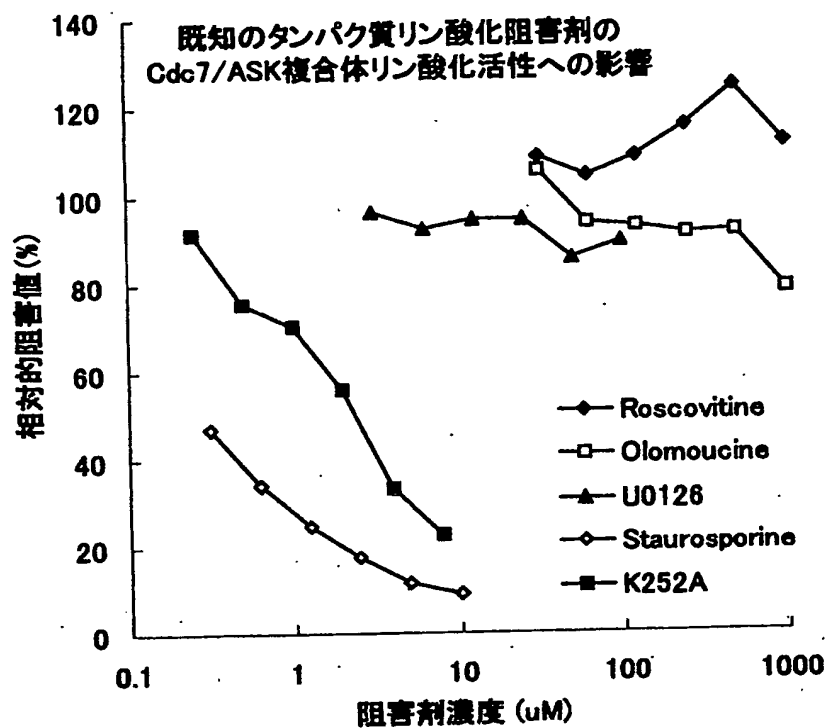
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 Cdc7-ASKキナーゼ複合体のリン酸化酵素活性測定方法の提供。

【解決手段】

本発明は、Cdc7-ASKキナーゼ複合体の基質であるMCMの、被リン酸化部位におけるリン酸化のレベルを指標とする、Cdc7-ASKキナーゼ複合体のリン酸化酵素活性測定方法を提供する。この測定方法に基づいて、被験化合物のCdc7-ASKキナーゼ複合体のリン酸化酵素活性に与える影響を評価することもできる。当該リン酸化酵素活性を阻害する化合物は、がんに対する特異性に優れた制がん剤として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

- |          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1998年 2月24日     |
| [変更理由]   | 名称変更            |
| 住 所      | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名      | 科学技術振興事業団       |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[598150570]

1. 変更年月日 1998年10月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区三田5-7-8 シャンボール三田620号

氏 名 正井 久雄

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390004097]

1. 変更年月日 1998年 7月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内  
ビル5F

氏 名 株式会社医学生物学研究所

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、クラッド径が約  $80\mu\text{m}$  と細径化された偏波保持光ファイバに関し、特にクラッド径  $125\mu\text{m}$  程度である通常の偏波保持光ファイバとの接続損失が大幅に低減した光ファイバに関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

従来、偏波保持光ファイバは、偏波依存性を有する光部品同士の接続用光ファイバとして用いられるほか、光ファイバグレーティングや光ファイバカプラなどの伝送用光部品として加工され、光ファイバジャイロスコープ等、各種光伝送装置、計測器等に利用されている。

この種の偏波保持光ファイバとしては、例えば、特許文献1、2に開示されているように、コアの両側のクラッド内に応力付与部を形成して前記コアに複屈折性を与えたものが広く用いられている。この構造の偏波保持光ファイバは、PANDA型偏波保持光ファイバと呼ばれ、偏波保持特性の良好なものを精度よく製造できるという優れた特徴をもつ。

## 【0003】

偏波保持光ファイバは、製造性、品質の安定性、通常の伝送用光ファイバとの接続性などを考慮し、クラッド径が  $125\mu\text{m}$  であるものが一般的である。そして、従来、偏波保持光ファイバを製造する際には、一般的に、該偏波保持光ファイバに所定の張力を印加してプルーフテストを行い、このプルーフテストで破断しなかったものを使用するようにしている。

## 【0004】

## 【特許文献1】

米国特許第4478489号明細書

## 【特許文献2】

特許第2750345号公報

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

光通信の大容量化や高密度化、ならびに光計測器の精密化により、光伝送用光部品や各種計測器の小型化の要請は非常に大きいものとなっている。また、光伝送用光部品や各種計測器では、内部に発熱体を有していることが多く、小型化による冷却効率の改善も望まれている。

しかしながら、従来のクラッド径  $125\ \mu\text{m}$  の偏波保持光ファイバでは、 $20\sim 30\text{ mm}$  よりも小さな曲げ半径にて曲げると、マイクロベント損失や破断確率の増大、特性や信頼性の低下が問題となる。このため、光部品間などの接続を光ファイバにより行った場合、光ファイバの曲げ半径に相当する空間が必要になり、光部品の小型化の阻害要因となっている。

## 【0006】

半径  $20\text{ mm}$  より小さい曲げ半径にて曲げることが可能な偏波保持光ファイバとしては、例えば、フジクラ技報第85号（1993年10月発行）中、「偏波保持光ファイバ」に報告されているように、クラッド径を  $80\ \mu\text{m}$  と細径化したジャイロスコープ用偏波保持光ファイバが知られている。

このジャイロスコープ用偏波保持光ファイバは、マイクロベント損失を抑制するため、コアとクラッドとの間の比屈折率差  $\Delta$ （以下、単に比屈折率差という）を通常の偏波保持光ファイバより大きく（例えば  $0.8\sim 1.2\%$ ）、モードフィールド径を小さく（例えば、波長  $0.85\ \mu\text{m}$  において  $3\sim 5\ \mu\text{m}$ 、波長  $1.55\ \mu\text{m}$  において  $5.5\sim 7.5\ \mu\text{m}$ ）した構造を有している。

## 【0007】

しかしながら、モードフィールド径を小さくすると、融着接続をした場合に軸ずれによる接続損失が大きくなりやすいという欠点がある。また、伝送用光ファイバなど、クラッド径  $125\ \mu\text{m}$  の一般的な通信用光ファイバと接続する場合にも、モードフィールド径の不整合による接続損失が非常に大きくなる。

前記ジャイロスコープ用偏波保持光ファイバは、他の光ファイバと接続する必要があるため、上述のような構造パラメータを採用することができたが、上記接続用などの偏波保持光ファイバとしては、接続損失は大きな問題となる。このため、上記ジャイロスコープ用偏波保持光ファイバに用いられた構造パラメータは

、接続用などの偏波保持光ファイバには採用することはできない。

【0008】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであって、クラッド径を $80\mu\text{m}$ 程度と細径化しても、優れた偏波保持特性を有するとともに、クラッド径 $125\mu\text{m}$ の偏波保持光ファイバとの接続に際する接続損失が極めて小さいものとなる偏波保持光ファイバを提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記課題を検討した結果、偏波保持光ファイバの比屈折率差、応力付与部の直径や間隔等の構造パラメータを最適化することにより、クロストークと接続損失をともに低減し、接続性と偏波特性を両立させることが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、前記課題は、コアの両側方に一对の応力付与部が設けられ、これらのコアおよび応力付与部がクラッドに包囲されてなる偏波保持光ファイバであって、クラッド径が $70\sim 90\mu\text{m}$ であり、応力付与部の直径が $21\sim 32\mu\text{m}$ であり、応力付与部間の間隔が $6\sim 17\mu\text{m}$ であり、コアとクラッドとの比屈折率差が $0.3\sim 0.5\%$ であることを特徴とする偏波保持光ファイバによって解決される。

【0010】

さらに、良好な特性を得るためには、 $0.98\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合、応力付与部の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部間の間隔を $8.5\sim 11\mu\text{m}$ とし、モード複屈折率を $3\times 10^{-4}$ 以上とし、波長 $0.98\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径を $5.3\sim 6.5\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

また、 $1.30\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合には、応力付与部の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部間の間隔を $9\sim 13\mu\text{m}$ とし、モード複屈折率を $3\times 10^{-4}$ 以上とし、波長 $1.30\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径を $7.1\sim 9.0\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

また、 $1.40\sim 1.63\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合には、応力付与部の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部間の間隔を $13\sim 16\mu\text{m}$ とし、モ

ード複屈折率を  $3 \times 10^{-4}$  以上とし、波長  $1.55 \mu\text{m}$  におけるモードフィールド径を  $8.5 \sim 10.5 \mu\text{m}$  とすることが好ましい。

上述の偏波保持光ファイバは、光ファイバ増幅器、半導体レーザ、変調器に用いられる偏波保持光ファイバとして好適であり、これにより、従来に比べて小型化された光ファイバ増幅器、半導体レーザ、変調器を製造することができる。

#### 【0011】

#### 【発明の実施の形態】

以下、実施の形態に基づいて、本発明を詳しく説明する。

図1は、本発明の偏波保持光ファイバの一例を示す概略断面図である。本発明の偏波保持光ファイバの構造は、図1に示すように、従来のPANDA型偏波保持光ファイバと同様に、コア1の両側方の対称位置に一对の応力付与部2、2が設けられ、これらコア1および応力付与部2、2がクラッド3で包囲された構造となっている。コア1には、クラッド3より屈折率が高い材料が用いられ、応力付与部2には、コア1およびクラッド3より熱膨張係数の大きい材料が用いられる。

これらの材料としては、従来のPANDA型偏波保持光ファイバに用いられている材料であれば、いずれのものを用いてもよいが、例えば、コア1としてゲルマニウムを添加（ドーピング）した石英を用い、各応力付与部2として、ホウ素を  $\text{B}_2\text{O}_3$  の断面重量濃度換算で  $17 \sim 21$  重量％程度ドーピングした  $\text{B}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$  ガラスを用い、クラッド3として純石英を用いる構成が例示される。

#### 【0012】

本発明の偏波保持光ファイバのクラッド径は  $70 \sim 90 \mu\text{m}$ 、より好ましくは  $77 \sim 83 \mu\text{m}$  となっている。また、各応力付与部2の直径Dは  $21 \sim 32 \mu\text{m}$  であり、応力付与部2、2間の間隔Rは  $6 \sim 17 \mu\text{m}$  であり、比屈折率差  $\Delta$  は  $0.3 \sim 0.5\%$  とされている。

これにより、クラッド径が細径化されているので、光ファイバの曲げ半径を  $13 \text{ mm}$  程度までと小さくすることが可能となり、しかも、偏波クロストークが小さく抑制され、優れた偏波保持特性を有するとともに、一般的な通信用光ファイバ（クラッド径  $125 \mu\text{m}$ ）と接続する際の接続損失も小さくなる。

## 【0013】

さらに、良好なファイバ特性を得るためには、 $0.98\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合、各応力付与部2の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部2、2間の間隔を $8.5\sim 11\mu\text{m}$ とし、モード複屈折率を $3\times 10^{-4}$ 以上とし、波長 $0.98\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径を $5.3\sim 6.5\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

また、 $1.30\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合には、各応力付与部2の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部2、2間の間隔を $9\sim 13\mu\text{m}$ とし、モード複屈折率を $3\times 10^{-4}$ 以上とし、波長 $1.30\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径を $7.1\sim 9.0\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

また、 $1.40\sim 1.63\mu\text{m}$ 帯( $1.55\mu\text{m}$ )用偏波保持光ファイバの場合には、各応力付与部2の直径を $22\sim 28\mu\text{m}$ とし、応力付与部2、2間の間隔を $13\sim 16\mu\text{m}$ とし、モード複屈折率を $3\times 10^{-4}$ 以上とし、波長 $1.55\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径を $8.5\sim 10.5\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

## 【0014】

以下、本発明の偏波保持光ファイバの上記構造パラメータを上記範囲内とすることの理由を説明する。

偏波保持光ファイバの偏波保持特性は、該偏波保持光ファイバの直交する2つの偏波モード(x偏波、y偏波)に対する等価屈折率 $n_x$ 、 $n_y$ の差( $n_x - n_y$ )であるモード複屈折率Bに依存することが知られている。このモード複屈折率Bが大きいほど、2偏波モード間の伝播定数差が大きくなり、該偏波保持光ファイバの偏波保持特性が向上する。

## 【0015】

図1に示すようなPANDA型偏波保持光ファイバの場合、モード複屈折率Bは、下記式(1)で表される(P. L. Chu et. al: "Analytical Method for Calculation of Stress and Material Birefringence in Polarization-Maintaining Optical Fiber," J. of Lightwave Technol. Vol. LT-2, No.5, Oct. 1984)。

【0016】

【数1】

$$B \equiv \frac{2EC}{1-\nu} (\alpha_2 - \alpha_3) T \left( \frac{d_1}{d_2} \right)^2 \cdot \left\{ 1 - 3 \left[ 1 - 2 \left( \frac{r}{b} \right)^2 \right] \left( \frac{d_2}{b} \right)^4 + 3 \left( \frac{r}{d_2} \right)^2 \cos 2\theta \right\} \dots (1)$$

【0017】

上記式(1)において、Bはモード複屈折率であり、Eは石英のヤング率であり、Cは光弾性係数であり、 $\nu$ はポアソン比であり、 $\alpha_2$ はクラッド3の熱膨張係数であり、 $\alpha_3$ は応力付与部2の熱膨張係数であり、Tは応力付与部2の融点と実使用環境温度との差であり、 $d_1$ は応力付与部2の半径であり、 $d_2$ はコア1の中心と応力付与部2の中心との距離であり、bはクラッド3の半径である。

また、rおよび $\theta$ は、コア1の中心を原点とする該偏波保持光ファイバ内部にある任意の点の座標を示し、 $r=0$ として偏波保持光ファイバのモード複屈折率を代表できる。

【0018】

この式(1)中、下記式(2)

【0019】

【数2】

$$\frac{2EC}{1-\nu} (\alpha_2 - \alpha_3) T \dots (2)$$

【0020】

で表される因子は、応力付与部2の材料により決定することができる。応力付与部2の材料は、一般的に $B_2O_3$ 添加石英が用いられており、ホウ素の添加量は、 $B_2O_3$ の断面重量換算で21重量%以下とすることが望ましい(例えば特願2001-009488号参照)。

このような応力付与部2の材料は、経験的に知られている値として、Eとして

$7830 \text{ kg/mm}^2$ 、 $\nu$ として0.186、 $(\alpha_2 - \alpha_3) T$ として $1.69 \times 10^{-3}$ という値を用いることにより、一般的な応力付与部2の材料を表現することができる。

【0021】

また、下記式(3)

【0022】

【数3】

$$\left(\frac{d_1}{d_2}\right)^2 \left\{ 1 - 3 \left[ 1 - 2 \left( \frac{r}{b} \right)^2 \right] \left( \frac{d_2}{b} \right)^4 + 3 \left( \frac{r}{d_2} \right)^2 \cos 2\theta \right\} \dots (3)$$

【0023】

で表される因子は、偏波保持光ファイバの構造パラメータにより決定され、モード複屈折率Bを大きくするためには、各応力付与部2の直径Dを大きくし、応力付与部2、2間の間隔Rを小さくすればよいことが分かる。

【0024】

ここで、クラッド径 $80 \mu\text{m}$ の偏波保持光ファイバについて、モード複屈折率Bを一定とした場合の応力付与部2の直径Dと、応力付与部2、2間の間隔Rとの関係の一例を、式(1)を用いて求めた。この結果を図2に示す。

【0025】

図2より、応力付与部2、2間の間隔Rを狭くすることにより、モード複屈折率Bを大きくできると分かる。しかし、実際には、図1に示すように、応力付与部2、2間の間隔Rは、コア1の直径より狭くすることはできない。

また、一般に、偏波保持光ファイバにおいては、光が伝播する領域は、図1に破線で示すように、コア1よりも広がっており、これをモードフィールド4という。モードフィールド4の直径すなわちモードフィールド径(MFD)は、一般に、光の伝播による電界強度が、コア1の中心に比して $1/e$ 倍( $e$ は自然対数の底)となる部分の直径である。

【0026】

応力付与部 2、2 間の間隔 R が狭いと、応力付与部 2 がクラッド 3 よりも低屈折率である影響により、モードフィールド 4 が非円化してしまい、接続損失が増大するおそれがある。モードフィールド 4 の非円率は、特願 2001-210648 号に記載されているように、接続損失を 0.3 dB 程度以下とするために、3.2% 以下であることが好ましい。このため、応力付与部 2、2 間の間隔 R はできるだけ大きいことが好ましく、図 2 に示す結果から、応力付与部 2 の直径 D は 21～32  $\mu\text{m}$  とすることが好ましい。

しかし、応力付与部 2 の直径 D が大きいと、応力付与部 2 の外側に位置するクラッド 3 の肉厚が薄くなり、製造が困難になることから、特に、22～28  $\mu\text{m}$  の範囲内とすることが好ましい。

【0027】

また、モード複屈折率 B は、クラッド径 125  $\mu\text{m}$  の偏波保持光ファイバの場合、 $3 \times 10^{-4}$  以上とすることが好ましいとわかっている。クラッド径が 80  $\mu\text{m}$  程度となると、一層側圧の影響を受けやすくなると推測され、少なくとも  $3 \times 10^{-4}$  以上であれば良好な偏波保持特性が得られるものと考えられる。従って、図 2 の結果から、応力付与部 2、2 間の間隔 R を 17  $\mu\text{m}$  以下とする必要があることが分かる。

【0028】

次に、応力付与部 2、2 間の間隔 R の下限値について考察する。第 1 および第 2 の偏波保持光ファイバを接続したときの結合効率  $\eta$  は、一般に、下記式 (4) で表されることが知られている。

【0029】

【数 4】

$$\eta = \left( \frac{2W_1W_2}{W_1^2 + W_2^2} \right)^2 \exp \left( - \frac{2d^2}{W_1^2 + W_2^2} \right)^2 \quad \dots(4)$$

【0030】

式 (4) において、 $W_1$  は第 1 の偏波保持光ファイバのモードフィールド 4 の

半径であり、 $W_2$  は第2の偏波保持光ファイバのモードフィールド4の半径であり、 $d$  は第1および第2の偏波保持光ファイバ間のコア1中心のずれ（軸ずれ）である。

【0031】

式（4）から、軸ずれ $d$ が0となる場合を考察する。 $d=0$ とすると、式（4）は下記式（5）

【0032】

【数5】

$$\eta = \left( \frac{2W_1W_2}{W_1^2 + W_2^2} \right)^2 \quad \dots(5)$$

【0033】

のように変形することができる。この式（5）から明らかなように、第1および第2の偏波保持光ファイバのMFDの差が大きいほど、結合効率は低下し、接続損失は大きくなる。

【0034】

また、 $W_1$  と  $W_2$  が等しい場合、式（4）は下記式（6）

【0035】

【数6】

$$\eta = \exp \left( - \frac{d^2}{W_1^2} \right) \quad \dots(6)$$

【0036】

のように変形される。この式（6）から明らかなように、モードフィールド径が小さいと、軸ずれ $d$ が小さい場合でも、接続損失が大きくなる。

【0037】

式（4）を用いて、 $W_1 = W_2$  のとき、通常起こりうる  $1 \mu\text{m}$  の軸ずれにより

生じる接続損失の大きさを図3に示す。

2本の偏波保持光ファイバを接続した時に生じうる接続損失としては、一般に、0.5 dB以下であることが望ましいとされている。図3から分かるように、1  $\mu$ mの軸ずれによる接続損失を0.5 dB以下とするためには、モードフィールド径（直径）は6  $\mu$ m以上であることが好ましい。従って、応力付与部2、2間の間隔Rも、最低限、6  $\mu$ m以上とする必要がある。

#### 【0038】

次に、偏波保持光ファイバの伝送帯波長に応じた、上記構造パラメータの特に好適な範囲について考察する。

光通信に用いられる光部品同士の接続用の偏波保持光ファイバは、波長0.98  $\mu$ m帯、1.30  $\mu$ m帯、あるいは1.55  $\mu$ m帯で用いられることが多い。0.98  $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバは、例えば、エルビウム添加光ファイバ増幅器（EDFA）の励起レーザの接続用ピグテールとして用いられる。また、1.30  $\mu$ m帯用および1.55  $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバは、例えば、半導体レーザや変調器の接続用ピグテールとして用いられている。

一般に、偏波保持光ファイバにおいては、伝送帯波長によりカットオフ波長が決まり、さらに、MFDの大きさも大体決まってくる。

#### 【0039】

まず、0.98  $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバに対する好適な構造パラメータの範囲について考察する。

0.98  $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバのMFDの代表値は、クラッド径125  $\mu$ mの従来の偏波保持光ファイバの場合、6.3  $\mu$ mである。この従来の偏波保持光ファイバに対して、MFDの異なる光ファイバを軸ずれ1  $\mu$ mを伴って接続したときの接続損失を前記式（4）により求めた結果を図4に示す。

#### 【0040】

軸ずれが1  $\mu$ mあると、すでに同一MFDの偏波保持光ファイバを接続した場合にも0.44 dBの接続損失を生じてしまう。0.44 dBから最悪0.2 dBの接続損失の劣化を許容すると、本実施の形態の0.98  $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバのMFDは、5.3  $\mu$ m以上とする必要があることが分かる。また、M

FDがあまりに大きいと、モードフィールド4の不整合による接続損失の増大が顕著になることから、波長 $0.98\mu\text{m}$ におけるMFDは $5.3\sim 6.5\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。

## 【0041】

波長 $0.98\mu\text{m}$ におけるMFDを上記範囲に限定した場合、応力付与部2、2間の間隔Rは、 $8.5\sim 11\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。前記間隔Rが $8.5\mu\text{m}$ 未満では、応力付与部2とコア1の間隔があまりに小さくなり、モードフィールド4が非円化して接続損失が増大するおそれがあるので好ましくない。また、前記間隔Rが $11\mu\text{m}$ を超えると、偏波保持特性が低下するので好ましくない。

## 【0042】

同様に、 $1.40\sim 1.63\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバに対する好適な構造パラメータの範囲について考察する。

$1.40\sim 1.63\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバの場合、MFDの代表値は $10.5\mu\text{m}$ である。接続損失を前記式(4)により求めると、結果は図5に示すようになった。この結果から、接続損失を $0.5\text{dB}$ 以下にするためには、本実施の形態の $1.40\sim 1.63\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバのMFDは、波長 $1.55\mu\text{m}$ において、 $8.0\mu\text{m}$ 以上とする必要があることが分かる。

また、MFDがあまりに大きいと、モードフィールド4の不整合による接続損失の増大が顕著になることから、MFDは $8.5\sim 10.5\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。

## 【0043】

波長 $1.55\mu\text{m}$ におけるMFDを上記範囲に限定した場合、応力付与部2間の間隔Rは、 $13\sim 16\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。前記間隔Rが $13\mu\text{m}$ 未満では、応力付与部2とコア1の間隔があまりに小さくなり、モードフィールド4の非円率が高くなるので好ましくない。また、前記間隔Rが $16\mu\text{m}$ を超えると、偏波保持特性が低下するので好ましくない。

## 【0044】

同様に、 $1.30\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバに対する好適な構造パラメータ

の範囲について考察する。

1. 30  $\mu\text{m}$ 用偏波保持光ファイバの場合、MFDの代表値は9.0  $\mu\text{m}$ である。接続損失を前記式(4)により求めると、結果は図6に示すようになった。この結果から、接続損失を0.5 dB以下にするためには、本実施の形態の1.40～1.63  $\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバのMFDは、波長1.30  $\mu\text{m}$ において、7.1  $\mu\text{m}$ 以上とする必要があることが分かる。

また、MFDがあまりに大きいと、モードフィールド4の不整合による接続損失の増大が顕著になることから、MFDは7.1～9.0  $\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。

#### 【0045】

波長1.30  $\mu\text{m}$ におけるMFDを上記範囲に限定した場合、応力付与部2間の間隔Rは、9～13  $\mu\text{m}$ の範囲内とすることが好ましい。前記間隔Rが9  $\mu\text{m}$ 未満では、応力付与部2とコア1の間隔があまりに小さくなり、モードフィールド4の非円率が高くなるので好ましくない。また、前記間隔Rが13  $\mu\text{m}$ を超えると、偏波保持特性が低下するので好ましくない。

#### 【0046】

以上説明したように、本発明の偏波保持光ファイバによれば、クラッド径を約80  $\mu\text{m}$ と細径化しても、優れた偏波保持特性を有するとともに、クラッド径125  $\mu\text{m}$ の光ファイバとの接続に際する接続損失が極めて小さいものとなる。

従って、この偏波保持光ファイバを、光ファイバ増幅器、半導体レーザ、変調器などの光伝送用光部品、光計測機器に用いられる接続用光ファイバとして用いることにより、該接続用光ファイバの曲げ半径を小さくすることができ、従来に比して著しく小型化することができる。

#### 【0047】

##### 〔具体例〕

以下に具体例に基づいて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの具体例は本発明を何ら限定するものではない。

0.98  $\mu\text{m}$ 帯用、1.30  $\mu\text{m}$ 帯用、および1.40～1.63  $\mu\text{m}$ 帯用の偏波保持光ファイバを、該光ファイバの構造パラメータを変えて複数作製した。

## 【0048】

偏波保持光ファイバの作製にあたっては、まず、比屈折率差 $\Delta$ が0.25%、0.35%、0.4%、0.45%、0.6%、1.0%となるように、ゲルマニウム（Ge）添加石英からなるコア部と、純石英からなるクラッド部とを有するVAD母材を用意した。次いで、所定の遮断波長が得られるように外周に石英ガラスを堆積させ焼結して、PANDA型偏波保持光ファイバのコアクラッド母材を得た。このコアクラッド母材のコア部の両側に、所定の位置および直径にて超音波ドリルで孔をあけ、この孔の内表面を研削および研磨して鏡面化することにより、孔開き母材を製造した。

## 【0049】

別途、MCVD法を用いて石英管の内側にホウ素（B）を $B_2O_3$ の断面重量濃度換算で21重量%程度添加した石英を堆積させて応力付与部のもととなる母材を得た。そして、この元母材の外周の石英管を研削により除去し、外表面が鏡面になるまで研磨することにより、偏波保持光ファイバの応力付与部となる応力付与部材を得た。この応力付与部材の直径は、前記孔開き母材の孔の直径より0.5mm程度細くされている。

## 【0050】

この応力付与部材を、前記孔開き母材に挿入し、線引き炉にて加熱し、クラッド径 $80\mu m$ になるように線引きを行った。線引き後の光ファイバに対して、2層の紫外線硬化型アクリレート樹脂を被覆し、光ファイバ素線を得た。この際、1層目被覆径は約 $122\mu m$ とし、2層目被覆径は約 $165\mu m$ とした。

## 【0051】

このようにして得られた偏波保持光ファイバに対して、伝送損失や出荷用ボビンに巻いたときの偏波クロストークの評価を行った。また、クラッド径 $125\mu m$ の偏波保持光ファイバとの融着接続損失評価を行った。

さらに、光部品を構成する際の接着剤の塗布による偏波保持特性の劣化を評価するため、図7に示すように、被験光ファイバ素線10の被覆11を $30\sim 40mm$ 程度除去して光ファイバ裸線12を露出させたのち、エポキシ系接着剤13を用いて台座14に固定し、硬化後の光ファイバ素線10の偏波クロストークを

測定した。

【0052】

これらの結果を各偏波保持光ファイバの構造パラメータと併せて表1～6に示す。

【0053】

【表 1】

	例1-1	例1-2	例1-3	例1-4	例1-5	例1-6
構造パラメータ						
比屈折率差 $\Delta$ (%)	0.25	0.35	0.4	0.45	0.6	1.0
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	23	23	23	23	23	23
応力付与部間の間隔Rとモードフィールド径MFDとの比率	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	16.8	16.0	14.8	14.2	11.9	8.9
波長1.55 $\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径 MFD ( $\mu\text{m}$ )	10.5	10.0	9.2	8.8	7.4	6.0
特性測定結果						
接続損失 (dB) (MFD 10.5 $\mu\text{m}$ の光ファイバとの接続)	0.01	0.03	0.12	0.18	0.52	1.25
モード複屈折率( $\times 10^{-4}$ )	2.6	3.0	3.2	3.4	3.7	4.9
接着剤によるロス劣化 (dB)	-5.9	-14.2	-15.8	-16.2	-17.0	-18.2
ボビング巻きによるロス劣化 (dB/100m)	-13.0	-22.1	-23.9	-25.0	-27.5	-28.9

【0054】

【表 2】

構造パラメータ	例1-7	例1-8	例1-3	例1-9	例1-10	例1-11
	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
比屈折率差 $\Delta$ (%)	23	23	23	23	23	23
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.1
応力付与部間の間隔Rとモードファイバ径MFDとの比率	16.2	15.5	14.8	13.5	12.9	10.0
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2
波長1.55 $\mu\text{m}$ におけるモードファイバ径MFD ( $\mu\text{m}$ )						
特性測定結果						
波長損失 (dB @1.55 $\mu\text{m}$ )	0.40	0.45	0.50	0.62	0.93	2.09
モードファイバ非円率 (%)	1.8	2.0	2.9	3.1	7.0	9.9
モード複屈折率B ( $\times 10^{-4}$ )	2.8	3.0	3.2	3.6	3.9	4.8
接着剤によるロス劣化 (dB)	-6.0	-14.9	-15.8	-17.2	-17.6	-18.5
ボビング巻きによるロス劣化 (dB/100m)	-12.8	-23.8	-23.9	-27.4	-27.8	-29.5

【0055】

【表 3】

	例2-1	例2-2	例2-3	例2-4	例2-5	例2-6
構造パラメータ						
比屈折率差 $\Delta$ (%)	0.25	0.35	0.4	0.45	0.6	1.0
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	23	23	23	23	23	23
応力付与部間の間隔Rとモードフィールド径MFDとの比率	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.8
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	11.8	9.9	9.2	8.8	7.6	6.9
波長0.98 $\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径 MFD ( $\mu\text{m}$ )	7.4	6.2	5.7	5.5	4.7	3.8
特性測定結果						
接続損失 (dB) (MFD 6.3 $\mu\text{m}$ の光ファイバとの接続)	0.30	0.29	0.29	0.33	0.49	1.18
モード複屈折率 ( $\times 10^{-4}$ )	4.2	4.8	4.9	5.9	5.7	6.1
接着剤によるロス劣化 (dB)	-8.2	-15.1	-18.1	-19.5	-20.7	-20.8
ボビツ巻きによるロス劣化 (dB/100m)	-28.0	-29.5	-29.6	-30.1	-33.7	-34.2

【0056】

【表4】

	例2-7	例2-8	例2-3	例2-9	例2-10	例2-11
構造パラメータ						
比屈折率差 $\Delta$ (%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	23	23	23	23	23	23
応力付与部間の間隔Rとモードファイバ径MFDとの比率	2.0	1.9	1.6	1.5	1.4	1.1
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	11.3	10.8	9.2	8.6	8.0	6.3
波長0.98 $\mu\text{m}$ におけるモードファイバ径MFD ( $\mu\text{m}$ )	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
特性測定結果						
波長損失 (dB @0.98 $\mu\text{m}$ )	0.47	0.48	0.50	0.50	0.51	0.73
モードファイバ非円率 (%)	0.8	0.9	2.5	3.1	6.8	9.8
モード複屈折率B ( $\times 10^{-4}$ )	4.2	4.3	4.9	5.1	5.6	6.1
接着剤による光損失劣化 (dB)	-8.0	-15.9	-18.1	-20.3	-20.5	-20.9
ボビソ巻きによる光損失 (dB/100m)	-27.3	-30.0	-29.6	-31.0	-33.3	-35.2

【0057】

【表 5】

構造パラメータ	例3-1	例3-2	例3-3	例3-4	例3-5	例3-6
比屈折率差 $\Delta$ (%)	0.25	0.35	0.4	0.45	0.6	1.0
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	23	23	23	23	23	23
応力付与部間の間隔Rとモードフィールド径MFDとの比率	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	15.4	12.5	11.5	11.1	8.9	8.5
波長1.30 $\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径 MFD ( $\mu\text{m}$ )	9.6	7.8	7.2	7.1	5.7	5.2
特性測定結果						
接続損失 (dB) (MFD 9.0 $\mu\text{m}$ の光ファイバとの接続)	0.03	0.05	0.20	0.25	0.35	1.28
モード複屈折率( $\times 10^{-4}$ )	3.0	3.4	4.2	4.4	4.9	5.2
接着剤によるロス劣化 (dB)	-7.0	-15.0	-16.8	-17.3	-18.9	-19.2
ボビング巻きによるロス劣化 (dB/100m)	-20.1	-26.9	-28.0	-28.1	-29.0	-30.0

【0058】

【表6】

	例3-7	例3-8	例3-3	例3-9	例3-10	例3-11
構造パラメータ						
比屈折率差 $\Delta$ (%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
応力付与部の直径D ( $\mu\text{m}$ )	23	23	23	23	23	23
応力付与部間の間隔Rとモードフィールド径MFDとの比率	1.9	1.7	1.6	1.5	1.2	1.1
応力付与部間の間隔R ( $\mu\text{m}$ )	13.5	12.5	11.5	10.5	8.9	7.9
波長1.30 $\mu\text{m}$ におけるモードフィールド径MFD ( $\mu\text{m}$ )	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
特性測定結果						
波長損失 (dB @1.30 $\mu\text{m}$ )	0.80	0.88	0.92	0.95	1.20	1.50
モードフィールド非円率 (%)	0.8	0.9	2.7	2.9	7.1	9.9
モード複屈折率B ( $\times 10^{-4}$ )	3.2	3.9	4.2	4.5	4.9	5.5
接着剤によるロス劣化 (dB)	-8.2	-16.3	-16.8	-18.1	-19.3	-23.0
ボビツ巻きによるロス劣化 (dB/100m)	-20.3	-27.1	-28.0	-29.9	-29.9	-33.0

【0059】

表1は、1.40～1.63  $\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバについて、応力付与部2が該光ファイバのモードフィールド4に与える影響を等しくして評価するた

め、応力付与部間隔  $R$  と  $MFD$  との比を一定にして、比屈折率差  $\Delta$  を変化させた比較を示す。

例 1-1、例 1-2、例 1-3、例 1-4 の偏波保持光ファイバは、クラッド径  $125\ \mu\text{m}$  の偏波保持光ファイバと融着接続したときの接続損失が、例 1-5、例 1-6 のものと比べて極めて低くなっている。さらに、例 1-2、例 1-3、例 1-4 のものは、例 1-1 のものと比較して、接着剤塗布時およびボビン巻き時の偏波クロストークが優れており、接続性と偏波保持特性を両立させたものであることが分かる。

#### 【0060】

また、表 2 には、 $1.40 \sim 1.63\ \mu\text{m}$  帯用偏波保持光ファイバについて、比屈折率差  $\Delta$  および  $MFD$  を一定にして、応力付与部 2、2 間の間隔  $R$  を変化させた比較を示す。

#### 【0061】

表 3 は、 $0.98\ \mu\text{m}$  帯用偏波保持光ファイバについて、応力付与部 2 が該光ファイバのモードフィールド 4 に与える影響を等しくして評価するため、応力付与部間隔  $R$  と  $MFD$  との比を一定にして、比屈折率差  $\Delta$  を変化させた比較を示す。

例 2-1、例 2-2、例 2-3、例 2-4 の偏波保持光ファイバは、クラッド径  $125\ \mu\text{m}$  の偏波保持光ファイバと融着接続したときの接続損失が、例 2-5、例 2-6 のものと比べて極めて低くなっている。さらに、例 2-2、例 2-3、例 2-4 のものは、例 2-1 のものと比較して、接着剤塗布時およびボビン巻き時の偏波クロストークが優れており、接続性と偏波保持特性を両立させたものであることが分かる。

#### 【0062】

また、表 4 には、 $0.98\ \mu\text{m}$  帯用偏波保持光ファイバについて、比屈折率差  $\Delta$  および  $MFD$  を一定にして、応力付与部 2、2 間の間隔  $R$  を変化させた比較を示す。

#### 【0063】

表 5 は、 $1.30\ \mu\text{m}$  帯用偏波保持光ファイバについて、応力付与部 2 が該光

ファイバのモードフィールド4に与える影響を等しくして評価するため、応力付与部間隔RとMFDとの比を一定にして、比屈折率差 $\Delta$ を変化させた比較を示す。

例3-1、例3-2、例3-3、例3-4の偏波保持光ファイバは、クラッド径 $125\mu\text{m}$ の偏波保持光ファイバと融着接続したときの接続損失が、例3-5、例3-6のものとは比べて極めて低くなっている。さらに、例3-2、例3-3、例3-4のものは、例3-1のものと比較して、接着剤塗布時およびボビン巻き時の偏波クロストークが優れており、接続性と偏波保持特性を両立させたものであることが分かる。

#### 【0064】

また、表6には、1.  $30\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバについて、比屈折率差 $\Delta$ およびMFDを一定にして、応力付与部2、2間の間隔Rを変化させた比較を示す。

#### 【0065】

次に、本発明の偏波保持光ファイバを用いることにより、光ファイバ増幅器の寸法をどれだけ小型化できるか実証するため、以下の手順により、光ファイバ増幅器を作製した。

まず、前記コアクラッド母材として、エルビウム添加光ファイバ(EDF)用の母材を製造し、上記製法と同様な製法により、クラッド径 $80\mu\text{m}$ の偏波保持型EDFを作製した。このEDFの特性を表7に示す。

#### 【0066】

【表 7】

構造パラメータ	
比屈折率差 $\Delta$ (%)	1.3
応力付与部の直径 $D$ ( $\mu\text{m}$ )	23
応力付与部間の間隔 $R$ とモードフィールド径 $MFD$ との比率	1.6
応力付与部間の間隔 $R$ ( $\mu\text{m}$ )	8.5
波長 $0.98 \mu\text{m}$ におけるモードフィールド径 $MFD$ ( $\mu\text{m}$ )	5.3
特性測定結果	
モード複屈折率 $B$ ( $\times 10^{-4}$ )	4.8
ポリンゲルによるロス係数 ( $\text{dB}/100\text{m}$ )	-30.5

## 【0067】

次いで、この偏波保持型 EDF を用いて、図 8 に示すような偏波保持型光ファイバ増幅器を作製した。この光ファイバ増幅器は、一般的な構成のものであり、信号光入力ポート 101 と、励起光入力ポート 102 と、 $980\text{nm} - 1550\text{nm}$  偏波保持光カプラ 103 と、偏波保持型 EDF 104 と、信号光出力ポート 105 と、2 個の偏波保持光アイソレータ 106、106 を有するものである。これらの各部品の間は、接続用光ファイバ 107 で接続されている。

## 【0068】

接続用光ファイバ 107 として、従来の  $125 \mu\text{m}$  外径の偏波保持光ファイバ

を用いたときには、接続用光ファイバ107の曲げ半径を20mm以下にすることができず、外形寸法は140mm×90mm×15mmであった。

これに対し、接続用光ファイバ107として、前記例1-3の1.40~1.63 $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバおよび前記例2-3の0.98 $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバを用いた場合には、接続用光ファイバ107の曲げ半径を13mm程度とし、光ファイバ増幅器の外形寸法を90mm×70mm×15mmにすることができた。体積にして約半分の小型の偏波保持型光ファイバ増幅器を製造することができた。

【0069】

#### 【発明の効果】

以上説明したように、本発明の偏波保持光ファイバによれば、クラッド径を70~90 $\mu$ m、より好ましくは、77~83 $\mu$ mと細径化しても、優れた偏波保持特性を有するとともに、クラッド径125 $\mu$ mの光ファイバとの接続に際する接続損失が極めて小さいものとなる。

従って、この偏波保持光ファイバを、光ファイバ増幅器、半導体レーザー、変調器などの光伝送用光部品、光計測機器に用いられる接続用光ファイバとして用いることにより、該接続用光ファイバの曲げ半径を小さくすることができ、従来に比して著しく小型化することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の偏波保持光ファイバの一例を示す概略断面図である。

【図2】 モード複屈折率Bを一定とした場合の応力付与部2の直径Dと、応力付与部2間の間隔Rとの関係の一例を示すグラフである。

【図3】  $W_1 = W_2$  のとき、モードフィールド半径と、1 $\mu$ mの軸ずれにより生じる接続損失と関係の一例を示すグラフである。

【図4】 0.98 $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバにおいて、MFDの異なる光ファイバを軸ずれ1 $\mu$ mを伴って接続したときの接続損失の一例を示すグラフである。

【図5】 1.40~1.63 $\mu$ m帯用偏波保持光ファイバにおいて、MFDの異なる光ファイバを軸ずれ1 $\mu$ mを伴って接続したときの接続損失の一例を

示すグラフである。

【図6】 1.  $30\mu\text{m}$ 帯用偏波保持光ファイバにおいて、MFDの異なる光ファイバを軸ずれ $1\mu\text{m}$ を伴って接続したときの接続損失の一例を示すグラフである。

【図7】 接着剤の塗布による偏波保持特性の劣化の評価方法を説明する図である。

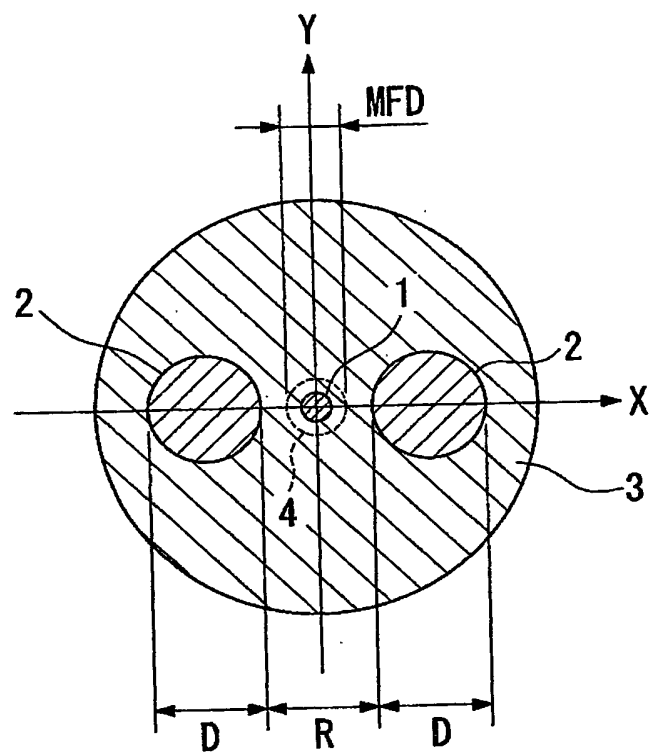
【図8】 偏波保持型光ファイバ増幅器の構成の一例を示す概略図である。

【符号の説明】

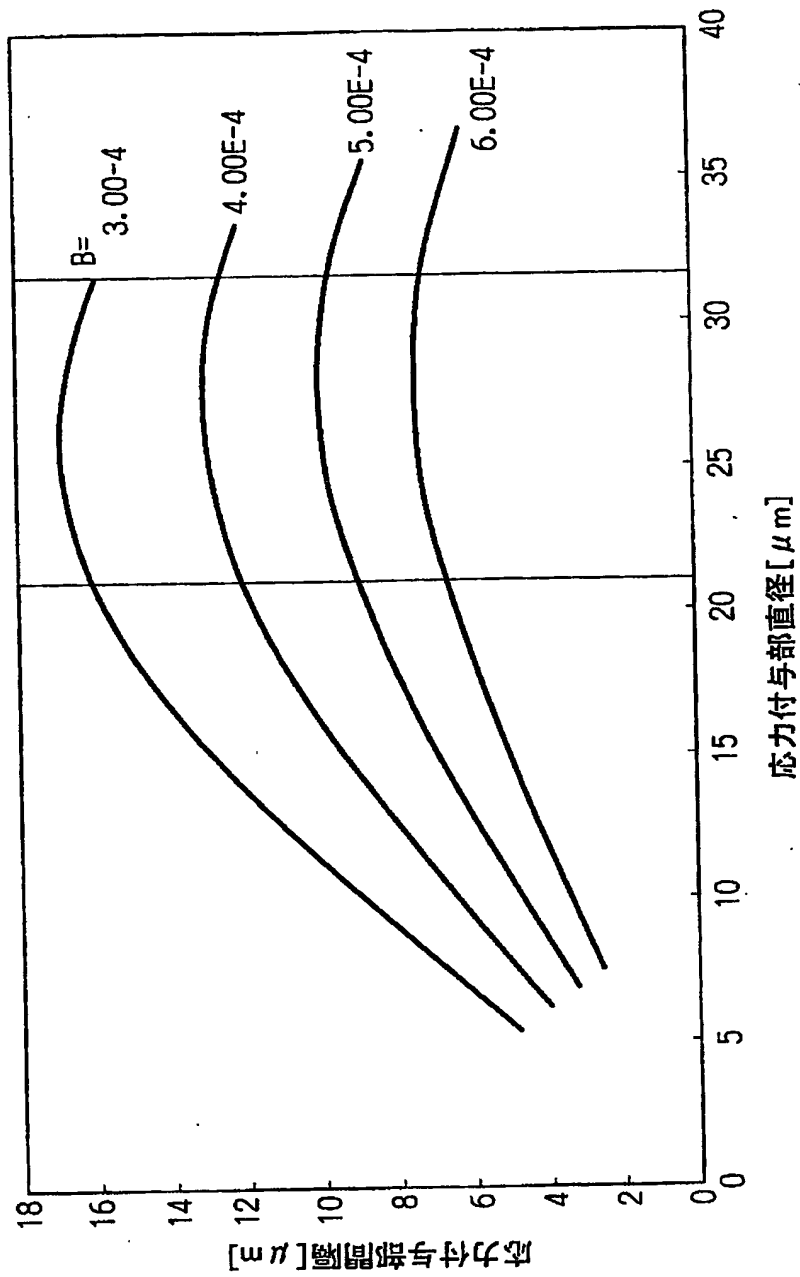
1…コア、2…応力付与部、3…クラッド、4…モードフィールド。

【書類名】 図面

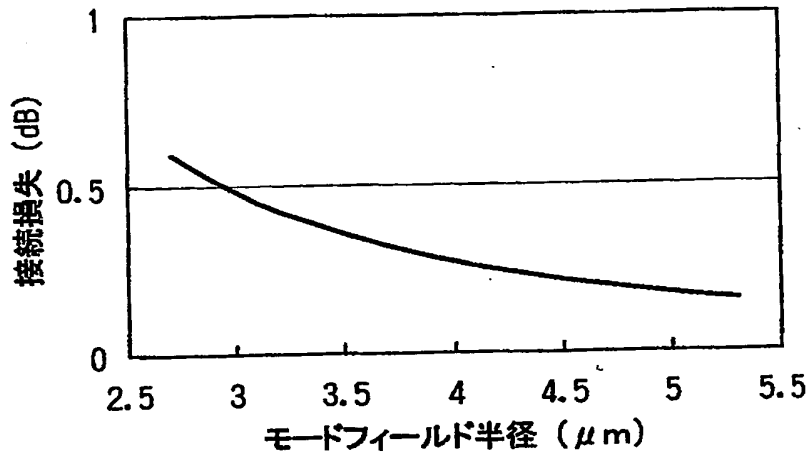
【図 1】



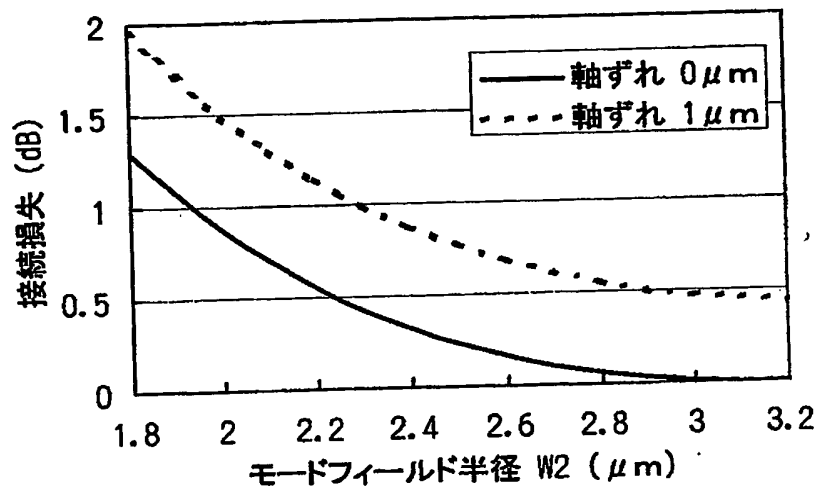
【図 2】



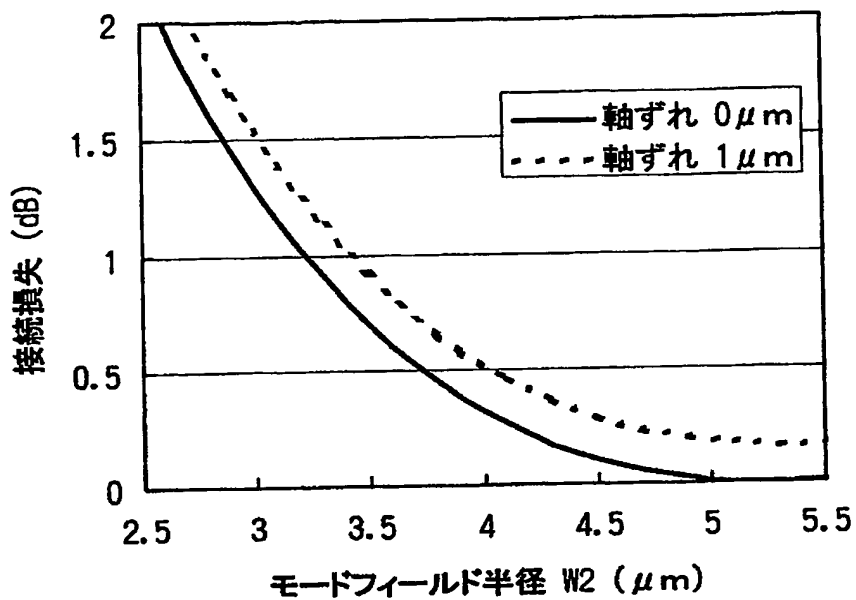
【図 3】



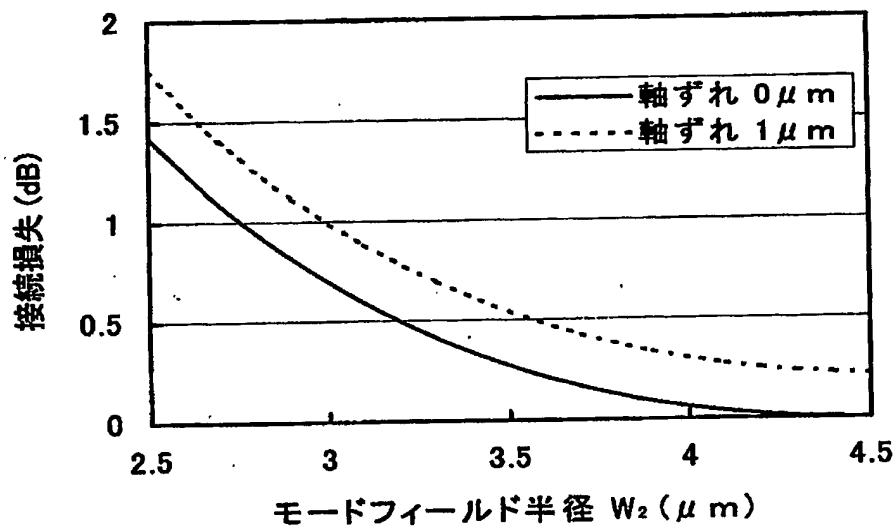
【図 4】



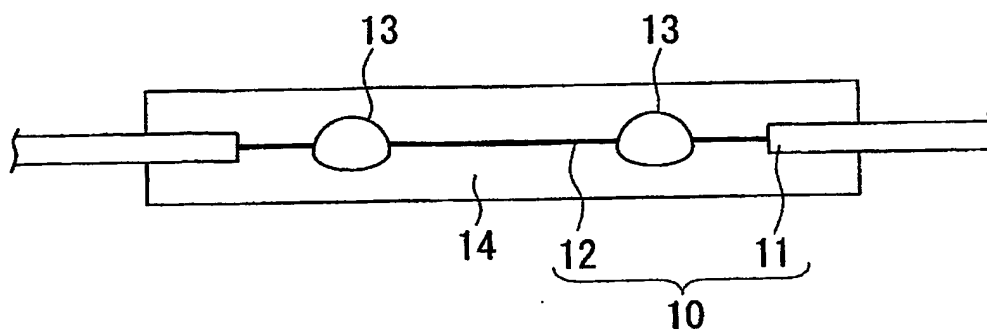
【図5】



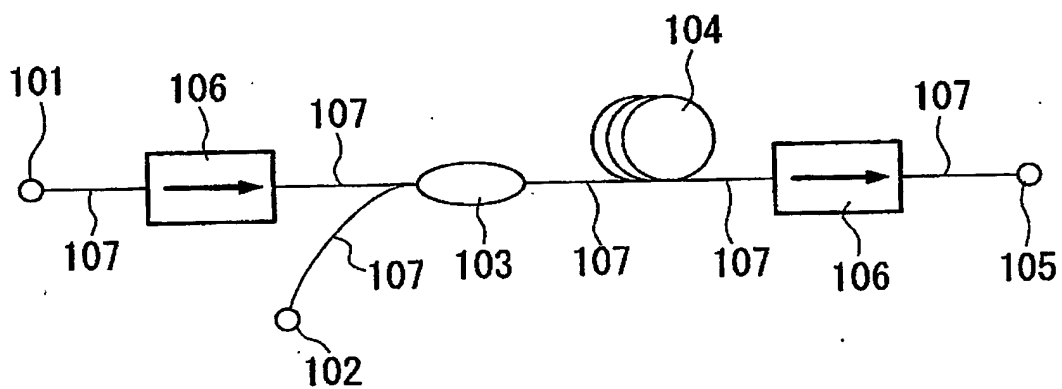
【図6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 クラッド径を約  $80\ \mu\text{m}$  と細径化しても、優れた偏波保持特性を有するとともに、クラッド径  $125\ \mu\text{m}$  の光ファイバとの接続に際する接続損失が極めて小さいものとなる偏波保持光ファイバを提供する。

【解決手段】 コア 1 の両側方に一对の応力付与部 2 が設けられ、これらのコア 1 および応力付与部 2 がクラッド 3 に包囲されてなる偏波保持光ファイバにおいて、各応力付与部 2 の直径  $D$  を  $21\sim 32\ \mu\text{m}$  とし、応力付与部 2、2 間の間隔  $R$  を  $6\sim 17\ \mu\text{m}$  とし、コア 1 とクラッド 3 との比屈折率差  $\Delta$  を  $0.3\sim 0.5\%$  とすることにより、モードフィールド径 (MFD) を十分に大きくすることができ、接続損失を低減することができる。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005186]

1. 変更年月日	1992年10月 2日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都江東区木場1丁目5番1号
氏 名	株式会社フジクラ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**